

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ILHOTAS PANCREÁTICAS
ISOLADAS DE RATOS WISTAR COM DIABETES
INDUZIDO PELA ESTREPTOZOTOCINA**

CURITIBA

1997

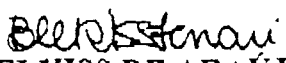
PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores Dr. ANTÔNIO CARLOS LERÁRIO, Dr. BELKISS DE ARAÚJO CARDOSO FERRARI e Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada pelo Dr. LUIZ CLÁUDIO BRUEL DE OLIVEIRA, intitulada: "AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS WISTAR COM DIABETES INDUZIDO PELA ESTREPTOZOTOCINA".

A Banca Examinadora considerou que o Dr. LUIZ CLÁUDIO BRUEL DE OLIVEIRA apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe CONCEITO "B", correspondente ao GRAU "10", ^{com LOUROS} sendo pois unanimemente recomendado a Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de MESTRE EM MEDICINA - área de concentração ENDOCRINOLOGIA e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 14 de novembro 1997.


Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS LERÁRIO


Prof. Dr. BELKISS DE ARAÚJO CARDOSO FERRARI


Prof. Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Mirnaluci Paulino Ribeiro Gama, pelo exemplo de dedicação aos seus alunos, seus pacientes, sua família e amigos e por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa e ensino da Medicina.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pela excelente orientação deste trabalho e por sua valiosa amizade.

Ao Dr. Stenio Lujan Camacho, pelo apoio e amizade.

À Dr^ª Edna de Jesus L. Barbosa, pela grande ajuda na execução da fase experimental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Mathias da Universidade Estadual de Maringá, que me deu as orientações iniciais em relação à técnica para isolamento de ilhotas pancreáticas.

À Dr^ª Flávia Shibata e Dr. Luis Carlos Woelner, pelo auxílio no radioimunoensaio para dosagens de insulina.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 HISTÓRIA DO DIABETES	3
3.2 CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOLOGIA DO DIABETES	6
3.3 A INSULINA	7
3.4 DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE (DMID) OU TIPO 1	7
3.5 DIABETES MELLITUS NÃO INSULINO-DEPENDENTE (DMNID) OU TIPO 2	8
3.6 SECREÇÃO DA INSULINA - TEORIA DA TOXICIDADE DA GLICOSE	9
3.7 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS	18
4 MATERIAL E MÉTODO	21
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	21
4.2 INDUÇÃO DE DIABETES COM ESTREPTOZOTOCINA	21
4.3 ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DOS ANIMAIS	22
4.4 TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DAS GLICEMIAS	22
4.5 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	22
4.6 TÉCNICA PARA O PREPARO DA COLAGENASE	25
4.7 TÉCNICA PARA O PROCESSO DE DIGESTÃO	25
4.8 TÉCNICA PARA SEPARAÇÃO DAS ILHOTAS	25
4.9 TÉCNICA PARA COLORAÇÃO COM AZUL DE TRIPAN	26

4.10	TÉCNICA PARA A CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE ILHOTAS	26
4.11	INCUBAÇÃO DAS ILHOTAS	26
4.12	DOSAGEM DA INSULINA	27
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5	RESULTADOS	31
5.1	ISOLAMENTO DAS ILHOTAS	31
5.2	PESO DOS ANIMAIS	31
5.3	GLICEMIAS	33
5.4	DOSAGENS DE INSULINA	35
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÕES	42
	ANEXOS	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

1	EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS	31
2	MÉDIAS DAS GLICEMIAS EM ESTADO ALIMENTADO	33
3	GLICEMIA EM JEJUM NA 8ª SEMANA	34
4	INSULINA OBTIDA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE.....	35
5	DOSAGEM DE INSULINA EM CONCENTRAÇÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE	36
6	INSULINA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA (BASAL) E PÓS ESTÍMULO NO GRUPO CONTROLE.....	36
7	DOSAGEM DE INSULINA NO GRUPO TRATADO EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE (BASAL) E APÓS ESTÍMULO.....	37

LISTA DE FIGURAS

1	IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO DUCTO BILIAR COMUM.....	23
2	DISTENÇÃO DO TECIDO PANCREÁTICO APÓS A INJEÇÃO INTRADUCTAL DA SOLUÇÃO DE HANKS COM COLAGENASE.....	24
3	ASPECTO DO PÂNCREAS APÓS A REMOÇÃO.....	24
4	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS	32
5	PROGRESSÃO DO PESO DOS ANIMAIS UTILIZANDO-SE A METODOLOGIA DE DADOS LONGITUDINAIS.....	32
6	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DA GLICEMIA AO LONGO DAS SEMANAS	33
7	EVOLUÇÃO DAS GLICEMIAS UTILIZANDO-SE OS MODELOS AJUSTADOS	34
8	INSULINA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE.....	35
9	DOSAGEM DE INSULINA EM CONCENTRAÇÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE	36
10	DOSAGEM DE INSULINA NO GRUPO CONTROLE EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE E APÓS ESTÍMULO.....	37
11	DOSAGEM DE INSULINA NO GRUPO TRATADO COM ESTREPTOZOTOCINA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE (BASAL) E PÓS ESTÍMULO	38

RESUMO

Neste estudo procedeu-se o isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos Wistar pelo método de digestão estática com collagenase. As ilhotas isoladas foram mantidas *in vitro* com diferentes concentrações de glicose para avaliação da secreção de insulina. Avaliou-se a produção de insulina de ilhotas de ratos normais e de ratos tratados com estreptozotocina no período neonatal, para reprodução do modelo de diabetes do tipo 2. O desenvolvimento dos animais foi acompanhado até a vida adulta, comprovando-se o diabetes no grupo tratado com estreptozotocina. A viabilidade das ilhotas isoladas foi comprovada pela coloração com azul de tripan. Encontrou-se diminuição na secreção de insulina estimulada pela glicose nas ilhotas dos ratos diabéticos em relação aos controles. Esta inabilidade da glicose em estimular a produção de insulina pode ser devido à exposição crônica das ilhotas à hiperglicemia nos ratos diabéticos.

ABSTRACT

In this study, pancreatic islets of Wistar rats have been isolated by the collagenase method. The isolated islets have been maintained *in vitro* with different concentrations of glucose to stimulate insulin secretion. Insulin production has been determined in islets from normal rats as well as in islets from rats that had been treated with streptozotocin in the neonatal period, in order to reproduce the type 2 diabetes model. The growth of the animals was followed until adult life to detect the development of diabetes. The viability of the isolated islets has been assessed by tripan blue stain. A decrease in insulin production has been found in islets from diabetic rats when compared with normal animals. This impairment in insulin release stimulated by glucose may be due to the chronic exposition of islets to hyperglycemia in diabetic rats.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é um grupo de desordens metabólicas caracterizado clinicamente pela elevação da glicemia, o que pode resultar da deficiência na secreção de insulina ou da resistência à sua ação.

A hiperglicemia crônica é responsável pelas complicações microvasculares do Diabetes, incluindo a nefropatia e retinopatia,^(16, 38, 77) sendo também implicada em complicações macrovasculares, como coronariopatia e acidente vascular cerebral.^(21, 36)

Além dos efeitos tóxicos da glicose, que ocasionam complicações crônicas, outro tipo de toxicidade tem sido reconhecido, no qual a hiperglicemia mantida causa efeito deletério na secreção de insulina pela célula beta. Esta toxicidade metabólica da glicose desempenha importante implicação na patogênese e tratamento do Diabetes, já que a hiperglicemia apresenta-se como fator de autoperpetuação do estado de Diabetes.⁽¹⁸⁾

O efeito tóxico da glicose sobre a célula beta tem sido reproduzido em modelos experimentais com ratos diabéticos induzidos por pancreatectomia parcial ou pela injeção de estreptozotocina, a fim de induzir um estado hiperglicêmico mantido, servindo assim para estudo funcional das células produtoras de insulina. As ilhotas pancreáticas destes modelos de Diabetes, quando estimuladas *in vivo* ou *in vitro*, demonstram supressão na secreção de insulina estimulada pela glicose.^(7, 8, 58, 80)

2 OBJETIVOS

- Desenvolver o modelo de Diabetes tipo II em ratos pela estreptozotocina inoculada no período neonatal.
- Reproduzir a técnica de isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos pelo método de digestão do pâncreas pela collagenase.
- Avaliar a secreção *in vitro* de insulina das ilhotas pancreáticas de ratos diabéticos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRIA DO DIABETES

O Diabetes é tão antigo quanto a História da Humanidade. Foi descrito pelos antigos Egípcios que o relataram, em um papiro encontrado em um túmulo de Tebas, como doença caracterizada por poliúria.

Na antiga Roma, Celsus (30 a.C.) descreveu em detalhes o quadro clínico do Diabetes. Aretaeus, médico romano da era Cristã, criou o termo Dia-betes que significava “passar através”, lembrando a semelhança da poliúria com a saída do vinho dos tonéis através de sifões.

Galeno (131-201 d.C.) classificou o Diabetes como sendo uma doença causada pela fraqueza renal. Os hindus (séculos V e VI d.C.) descreveram o quadro clínico do Diabetes e associaram aos sintomas o sabor adocicado da urina.

Avicenna (960-1037), médico árabe, relacionou o quadro do Diabetes com impotência sexual e gangrena.

O médico suíço Hohenhein (século XVI), que se autodenominou Paracelsus, relatou que a urina dos diabéticos, após evaporação, continha um resíduo que concluiu tratar-se de sal. Acreditava que o Diabetes ocorria por deposição de sal nos rins.

Em 1674, Thomas Willis, professor de Oxford, redescobriu os relatos hindus descrevendo o sabor adocicado da urina dos diabéticos.

Cawley, em 1788, relatou em autópsia de paciente com sintomas de Diabetes, a presença de cálculos e alterações morfológicas no pâncreas. Contudo, não fez associação do achado patológico com a doença do paciente.

Durante o século XVIII, persistia a procura da etiologia do Diabetes e a maioria dos estudiosos acreditava que a causa seria disfunção renal. Para outros, a causa estaria no fígado, já que era comum o achado de esteatose hepática nas autópsias. Rollo, ainda no século XVIII, propôs dieta pobre em carboidratos para os

diabéticos acreditando que a doença era causada por disfunção do estômago e promovia superprodução de açúcar a partir dos alimentos de origem vegetal. Também foi Rollo quem acrescentou o termo Mellitus para distinguir o Diabetes de outros estados de poliúria com urina sem sabor, Diabetes Insipidus.

Em 1815, Chevreuil demonstrou que a glicose era a substância redutora presente na urina dos diabéticos e pode comprovar, pela primeira vez, a presença de hiperglicemia.

Claude Bernard (1813 - 1878), estudou a hipótese do pâncreas ser a causa do Diabetes. Produziu atrofia do órgão por ligadura do ducto pancreático de cães e acreditava que a destruição do pâncreas fosse completa. Como os animais não ficaram diabéticos, concluiu que não estava no pâncreas a causa do Diabetes. Também defendeu a hipótese da origem central da doença, já que produzia Diabetes experimental com punção do 4º ventrículo.

Buchardat em 1875, publicou *De La Glycosuria ou Diabète Sucré*, onde descreveu o tratamento dietético e diferenciou os pacientes jovens e magros que respondiam mal à dieta, dos pacientes idosos e obesos, os quais apresentavam melhor resposta ao tratamento. Acreditava que só o Diabetes não responsivo à dieta era de origem pancreática.

As idéias de Buchardat foram compartilhadas por Lancereaux o qual também justificou que as autópsias geralmente não revelavam alteração pancreática porque a maioria dos diabéticos era do tipo obeso.

Em 1869, em Berlim, Paul Langerhans descreveu a histologia do pâncreas. Notou a presença de agrupamentos celulares, que chamou de ilhotas, as quais não se comunicavam com o tecido acinar. Langerhans não sugeriu nenhuma hipótese para a função das ilhotas.

Minkowski, em 1889, auxiliado por Mering, fez pancreatectomia total em cães para estudar o papel do pâncreas na digestão de gorduras. Alertado pelo funcionário que cuidava do biotério de que os cães pancreatectomizados desenvolviam poliúria e polidipsia, diagnosticou a presença de Diabetes nos animais. Entusiasmado

com a descoberta, procedeu enxerto de tecido pancreático no espaço subcutâneo dos cães pancreatectomizados obtendo reversão do Diabetes.

Em 1893, Laguesse sugeriu que as ilhotas descritas por Langerhans produziram alguma substância capaz de controlar a glicemia.

Em 1910, Jean de Meyer propôs que a substância pancreática controladora da glicemia devia chamar-se insulina, devido a sua origem ser as “insulae” de Langerhans.

No início deste século, vários pesquisadores desenvolveram extratos de pâncreas para tratamento do Diabetes, mas devido a variação na potência e toxicidade pelas diversas proteínas presentes, não conseguiram sucesso.

Coube a Frederick Banting, ajudado por Charles Best e James Collip o isolamento e purificação da insulina, bem como a padronização da dosagem.

O primeiro paciente tratado com insulina foi Leonard Thompson, com 14 anos, que em 23 de janeiro de 1922 recuperou-se de cetoacidose diabética no Hospital Geral de Toronto.

A partir de 1923 a insulina já estava disponível para uso comercial e uma nova era no tratamento do Diabetes havia começado.

Em 1942 descobriu-se o poder hipoglicemiante das sulfoniluréias acidentalmente, durante o tratamento de pacientes com febre tifóide com gliprothiazole.

A partir de 1955, as sulfoniluréias hipoglicemiantes passaram a ser comercializadas, revolucionando o tratamento dos diabéticos não insulino dependentes.

Nos dias de hoje, as pesquisas nas áreas da fisiopatologia e tratamento do Diabetes são inúmeras. Novas drogas hipoglicemiantes, insulina humana recombinante, análogos de insulina e mesmo o transplante de ilhotas de Langerhans já são realidade.

Como se vê, a História do Diabetes é antiga e rica. Excelentes revisões contam em detalhes toda a evolução do conhecimento científico nesta área.^(1, 4, 11, 39, 40, 48, 85)

3.2 CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOLOGIA DO DIABETES

O Diabetes Mellitus é entidade clínica com expressão variável, que se caracteriza por hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia, emagrecimento e por vezes cetose, com repercussões no metabolismo glicídico, lipídico, protéico e hidromineral. A longo prazo caracteriza-se por macroangiopatia (aterosclerose) e lesões microangiopáticas que comprometem os olhos, rins, nervos, músculos, pele, osso, placenta, etc.⁽⁴⁰⁾

Devido às suas diferentes apresentações, várias classificações foram propostas para o Diabetes. A mais usada é a do *National Diabetes Data Group* (NDDG) que foi adotada pela Organização Mundial de Saúde em 1980 e modificada em 1985 (quadro 1).⁽⁵²⁾

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS, SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

CLASSES CLÍNICAS	CLASSES DE RISCO
Diabetes Mellitus	Intolerância Prévia à Glicose
Diabetes Mellitus Insulino-dependente	Potencial Intolerância à Glicose
Diabetes Mellitus Não Insulino-dependente	
Diabetes relacionado à desnutrição	
Diabetes Mellitus Secundário	
Intolerância à glicose	
Diabetes Mellitus Gestacional	

O NDDG também definiu os critérios para diagnóstico de Diabetes que compreendem a comprovação de duas glicemias plasmáticas em jejum maiores ou iguais a 140 mg% ou glicemia maior ou igual a 200 mg% duas horas após sobrecarga oral de glicose. Recentemente o comitê internacional de especialistas, convocados pela Associação Americana de Diabetes, revisou os critérios do NDDG e propôs o diagnóstico de Diabetes com glicemia em jejum maior ou igual a 126mg%. Também elaborou nova classificação da doença baseada nos atuais conhecimentos sobre fisiopatologia e herança genética.⁽⁷⁸⁾

Dentre as classes clínicas de Diabetes propostas pelo NDDG, as de maior prevalência são o Diabetes Mellitus Insulino-dependente (DMID) ou tipo 1 e o Diabetes Mellitus Não Insulino-dependente (DMNID) ou tipo 2. Pode-se dizer que o

DMID ocorre no paciente que não produz insulina e o DMNID ocorre quando a produção de insulina é insuficiente ou existe resistência à sua ação.

3.3 A INSULINA

A insulina é o principal hormônio regulador do metabolismo da glicose. Atua suprimindo a produção de glicose pelo fígado e controlando a oxidação e armazenamento desta nos tecidos sensíveis à sua ação.⁽⁷²⁾

As células beta, localizadas nas ilhotas pancreáticas de Langerhans são a fonte de toda insulina endógena. As ilhotas são porções de tecido endócrino permeadas entre a porção exócrina do pâncreas. Além das células beta, as ilhotas contêm células alfa, que produzem glucagon, células delta produtoras de somatostatina e células produtoras do polipeptídeo pancreático. O tamanho das ilhotas pode variar desde poucas células com cerca de 40 µm de diâmetro, até 5000 células e 400 µm. As células beta correspondem a 70 a 80% do volume da ilhota.⁽⁹⁾

A insulina é produzida como um polipeptídeo precursor (preproinsulina) que, após perder sua porção N-terminal, se transforma em proinsulina. Esta fica armazenada na célula beta até ser liberada nas formas de insulina e peptídeo C quando a célula é estimulada.⁽³¹⁾

3.4 DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE (DMID) OU TIPO 1

Doença crônica que resulta da destruição auto-imune das células beta pancreáticas produtoras de insulina.

A incidência da doença é bastante variável desde 2 casos por 100.000 habitantes/ano no Japão, até 40 casos por 100.000 habitantes/ano na Finlândia.⁽²⁹⁾

A susceptibilidade ao DMID é herdada e relacionada com o sistema de antígenos de histocompatibilidade. Determinados tipos de HLA de classe II como o DR3 e DR4 aumentam o risco de desenvolver a doença, enquanto que DR2 e DR5 protegem contra o surgimento. Além do HLA, outros genes também estão envolvidos na susceptibilidade ao DMID como o gene do transportador envolvido na apresentação de antígenos.

O processo de destruição da célula beta é crônico e muitas vezes ocorre por anos antes do aparecimento do quadro clínico do Diabetes. O achado histológico precoce é a presença de “insulite”, com infiltrado linfocitário, característico de processo inflamatório crônico.

A auto-imunidade no DMID é confirmada pela presença de anticorpos contra constituintes da célula beta, como a insulina, descarboxilase do ácido glutâmico, carboxipeptidase H e outras proteínas da célula.

Duas hipóteses principais tentam explicar a fisiopatologia do DMID. Primeiramente, ocorre resposta imune contra uma proteína viral que tenha características semelhantes à proteínas da célula beta, podendo assim desencadear reação auto-imune cruzada. Alternativamente, uma lesão inicial da célula beta secundária à infecção viral, poderia levar à expressão de auto-antígenos da célula desencadeando o processo inflamatório.⁽²⁾

Estudos histológicos sugerem que 80% das células beta devem ser destruídas para se produzir os sintomas de Diabetes.⁽⁵⁹⁾

Uma vez instalado o DMID, o paciente desenvolve hiperglicemia e aumento na lipólise. O aumento na oxidação dos ácidos graxos produz cetonemia e acidose metabólica cuja reversão só se dá com a administração de insulina.

No início da doença, quando o paciente é hiperinsulinizado, ocorre recuperação parcial nas células beta que também tem sido conseguida com terapias imunossupressoras ou nicotinamida, que modula a regeneração celular.⁽²⁾

3.5 DIABETES MELLITUS NÃO INSULINO-DEPENDENTE (DMNID) OU TIPO 2

Este tipo de Diabetes compreende aproximadamente 90% dos casos da doença. Assim como o Diabetes tipo 1, tem características genéticas que se apresentam com maior variação no tipo 2. Fatores ambientais também são importantes na fisiopatologia do DMNID, sendo o mais comum a obesidade gerada pela alta ingestão calórica e sedentarismo.

Apesar da hiperglicemia, os pacientes com DMNID têm baixos níveis de cetonas e o tratamento com insulina não é necessário para o controle glicêmico na maioria das vezes.

Este tipo de diabetes ocorre por ação deficiente da insulina nas células alvo, por secreção insuficiente de insulina ou uma combinação dos dois fatores. A deficiência de insulina leva a hiperglicemia e outros distúrbios metabólicos, mas não causa alteração da lipólise suficiente para produzir cetonúria. Ao contrário do Diabetes do tipo 1, o paciente com Diabetes tipo 2 muitas vezes é assintomático.

O DMNID pode ocorrer em qualquer idade. Certas formas de aparecimento na adolescência ou adultos jovens têm forma dominante de herança genética. O termo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) tem sido usado nestes casos, onde o mecanismo da doença é bastante heterogêneo entre as diversas famílias estudadas.

Várias alterações foram descritas como causas de Diabetes do tipo 2, citam-se mutações no receptor da insulina, anticorpos anti-receptores, anormalidades estruturais na molécula de insulina e defeitos da sinalização da glicose na célula beta por alteração genética ou dessensibilização da célula.^(3, 22, 77)

3.6 SECREÇÃO DA INSULINA - TEORIA DA TOXICIDADE DA GLICOSE

A glicose é o principal estímulo para a célula beta secretar a insulina e, além de estimular a secreção diretamente, também modula a resposta da célula beta a outros secretagogos.⁽⁴⁶⁾

A secreção da insulina é complexa e também envolve o sistema nervoso autônomo. ROBERTSON e PORTE mostraram que o receptor beta adrenérgico e a glicemia agem de forma independente como estímulos à célula beta.⁽⁶⁵⁾

MATHIAS demonstrou em ilhotas de rato perfundidas *in vitro*, que os agentes colinérgicos estimulam a secreção de insulina, mesmo em presença de concentrações não secretagogas de glicose.⁽⁴⁹⁾

Fatores hormonais também estão envolvidos no controle da célula beta. A somatostatina é capaz de inibir o influxo de cálcio intracelular envolvido na secreção

da insulina.⁽⁷⁴⁾ Usando clones de células produtoras de insulina, REDMON e colaboradores mostraram que a epinefrina e a somatostatina têm a capacidade de inibir a expressão do gen da insulina e conseqüentemente bloquear a sua produção.⁽⁶²⁾

Em condições normais a célula beta responde à glicose de forma bifásica. Ocorre secreção inicial de insulina (1ª fase), que dura cerca de dez minutos, e depois a fase mais prolongada (2ª fase), cuja duração depende da permanência do estímulo. A 1ª fase não é influenciada pelos níveis de glicose pré-estímulo, enquanto a 2ª fase é diretamente proporcional ao nível de glicose prévio.⁽⁵⁶⁾

Para estimular a célula beta, a glicose liga-se ao receptor de membrana específico (GLUT 2) e ativa a fosfolipase C. Esta enzima promove a hidrólise dos fosfoinosítídeos da membrana celular formando diacilglicerol e inositol-fosfato. Este último promove o aumento do cálcio intracelular e ativa a C-quinase, ambos implicados na secreção da insulina.^(61, 87)

Além de estimular a secreção de insulina a glicose também é capaz de regular a síntese do hormônio. Mostrou-se que o aumento da glicose extracelular estimula a transcrição e prolonga a meia vida do RNA mensageiro para a síntese de insulina. Por outro lado, a diminuição da glicose pode inibir a transcrição do mesmo RNA.⁽⁵⁷⁾

O Diabetes Mellitus do tipo 1 ocorre quando a secreção de insulina está bastante comprometida. A hiperglicemia só se desenvolve quando se diminui em 80 a 90% o número de células beta.⁽²⁰⁾

Os pacientes com Diabetes do tipo 2 não apresentam diminuição no número de células beta, mas muitas vezes a secreção de insulina encontra-se diminuída. Este fato sugere a existência de defeito funcional no processo de secreção. Atualmente admite-se que a hiperglicemia mantida pode exacerbar os defeitos na secreção da insulina perpetuando o estado diabético. Modelos experimentais de diabetes, em ratos parcialmente pancreatectomizados e ratos tratados com estreptozotocina no período neonatal, têm sido utilizados para comprovar esta possibilidade.

A estreptozotocina é um agente alquilante do grupo das nitrosouréias. Sua ação é direta sobre o DNA da célula interferindo na integridade e função. Tem afinidade pelas células beta pancreáticas e é usada no tratamento de carcinoma de células da ilhota e tumor carcinóide.⁽¹²⁾

PORTHA e col. relataram, em 1974, que a injeção de estreptozotocina em ratos recém-nascidos promovia lesão nas células beta com conseqüente hiperglicemia que revertia espontaneamente após alguns dias. Paralelamente à melhora da hiperglicemia, o conteúdo pancreático de insulina aumentava sugerindo que a hiperglicemia estimulava a produção de insulina e a replicação das células beta. Isto ocorria até ser atingida uma massa mínima de células, capaz de manter a normoglicemia. O grau de recuperação era dependente da severidade inicial do diabetes. Após três semanas da injeção de estreptozotocina, os ratos que receberam doses maiores apresentavam diminuição no conteúdo pancreático de insulina e aumento na glicemia, enquanto que os ratos tratados com doses menores só apresentavam alterações após sobrecarga de glicose.⁽⁵⁸⁾

BONNER-WEIR⁽⁸⁾ e col. usaram o modelo de rato tratado com estreptozotocina no período neonatal (modelo de Diabetes tipo 2) para estudar o efeito crônico da hiperglicemia sobre a célula beta. Neste estudo, ratos com dois dias de vida foram tratados com estreptozotocina e comparados com outro grupo de ratos normais. Foram avaliadas a glicemia e insulina plasmáticas, morfologia pancreática e conteúdo hormonal pancreático em várias fases. Com quatro dias de vida, os ratos tratados ficaram hiperglicêmicos ao mesmo tempo em que apresentavam grande diminuição no número de células beta. Por volta de dez dias de vida a glicemia normalizou-se e havia recuperação parcial no número de células produtoras de insulina. Após seis semanas de vida os ratos voltaram a ficar hiperglicêmicos e o nível de insulina era só 30% dos controles, enquanto que o número de células beta correspondia a cerca de 70% dos controles. Esta discrepância entre a insulinemia e o número de células beta sugeriu que algum mecanismo estava inibindo a secreção de insulina. Concluiu-se que a exposição crônica da célula beta à hiperglicemia seria o mecanismo responsável. Ainda havia a

possibilidade de que a lesão provocada pela estreptozotocina pudesse ter causado danos residuais às células beta sobreviventes levando a alteração funcional.

Para afastar a possibilidade de efeito residual da estreptozotocina, os mesmos pesquisadores desenvolveram o modelo de rato diabético pós-pancreatectomia parcial.⁽⁷⁾ Neste estudo os ratos foram pancreatectomizados com remoção de 80 a 90% do tecido pancreático, levando a um estado de hiperglicemia leve de jejum com intolerância leve a moderada à glicose. Como não havia exposição das células beta residuais a nenhum agente químico, era de se esperar que sua função fosse normal a não ser que a hiperglicemia desenvolvesse alteração funcional nestas células. Quando as ilhotas foram removidas e colocadas em perfusão *in vitro* de glicose notou-se comprometimento tanto na 1ª quanto na 2ª fase de secreção de insulina sugerindo um defeito funcional adquirido nas células beta residuais.

Em 1982, CLARK e colaboradores⁽¹⁴⁾ usaram o modelo de diabetes por pancreatectomia parcial e analisaram o efeito da hiperglicemia crônica sobre as ilhotas remanescentes. Compararam ratos diabéticos não tratados com ratos que receberam insulina para evitar a hiperglicemia. Concluíram que os ratos expostos à hiperglicemia crônica apresentavam ilhotas desorganizadas e aumentadas de tamanho, com áreas de fibrose que não eram vistas quando a hiperglicemia era prevenida com o tratamento com insulina.

BOLAFFI e col. em 1986,⁽⁵⁾ estudaram ilhotas de ratos normais isoladas e colocadas em microcâmaras para perfusão *in vitro*. Desta maneira as ilhotas eram continuamente estimuladas com glicose havendo em contrapartida, secreção bifásica, reproduzindo as duas fases da secreção da insulina. Observou-se que, se o estímulo fosse prolongado por mais tempo, uma terceira fase podia ser detectada onde havia diminuição da secreção de insulina em proporção ao nível da glicose. Concluiu-se que o processo não ocorria por exaustão da célula beta já que o conteúdo de insulina nas células estava diminuído em apenas 20%, enquanto a diminuição na secreção de insulina era da ordem de 75%.

Se a hiperglicemia é a responsável pela menor secreção de insulina nos modelos de ratos com estreptozotocina neonatal, pancreatectomia parcial ou estimulação da célula beta *in vitro*, era de se esperar que ratos normais expostos a infusão prolongada de glicose apresentassem o mesmo defeito. Isto foi demonstrado por LEAHY e colaboradores⁽⁴³⁾ que infundiram glicose continuamente por 48 horas em ratos normais fazendo com que diminuísse a influência da glicose sobre a secreção de insulina. O defeito verificado era mais pronunciado quanto maior a quantidade de glicose infundida.

Em outro estudo, o mesmo grupo de LEAHY⁽⁴⁴⁾ manteve infusão de glicose em ratos normais por até 96 horas. Após este período os animais foram anestesiados e o pâncreas colocado em um sistema de perfusão para avaliar a secreção de insulina com diferentes estímulos. Um grupo de ratos recebeu, após 48 horas de infusão de glicose, a adição de florizina. Esta droga age diminuindo a reabsorção tubular de glicose, promovendo glicosúria e normalização da glicemia. Verificaram que os ratos infundidos com glicose tinham diminuição na secreção de insulina após estímulo com 16,7 mM de glicose e que este defeito era revertido nos ratos que receberam a adição de florizina. Portanto, concluíram que a contínua estimulação da célula beta pela glicose era a causa do defeito na secreção de insulina.

O nível de glicemia necessário para produzir a alteração secretória da célula beta não precisa ser muito elevado. Em ratos com pancreatectomia de 60%, que não é suficiente para promover hiperglicemia, observou-se que adicionando-se sacarose a 10% na água os animais desenvolviam leve hiperglicemia no estado alimentado. A perfusão do pâncreas residual mostrou que os ratos que receberam sacarose tiveram 75% de redução na secreção estimulada de insulina em comparação com ratos que receberam dieta padrão. Demonstrou-se assim que a elevação pequena e crônica da glicemia pode levar à alteração na secreção de insulina.⁽⁴⁵⁾ A hiperglicemia mantida também pode causar alterações na resposta da célula beta a outros estímulos.⁽²⁴⁾ Secretagogos naturais como arginina, leucina e outros aminoácidos e agentes químicos

como isoproterenol, sulfoniluréias ou 3isobutil-1-metilxantina (IBMX) promovem secreção de insulina e seu efeito é potencializado pelo aumento da glicemia.

ROSSETTI e colaboradores,⁽⁶⁸⁾ usando o modelo de rato diabético pós-pancreatectomia parcial (90%), estudaram *in vivo* a secreção de insulina estimulada por glicose, arginina ou glicose mais arginina. Compararam os ratos hiperglicêmicos com grupo controle e grupo pancreatectomizado tratado com florizina para normalizar a glicemia. Verificaram que nos ratos hiperglicêmicos havia diminuição nas duas fases de secreção de insulina em resposta à glicose, resposta aumentada à arginina em condições basais de glicemia e inabilidade da glicose potencializar a secreção estimulada pela arginina, como ocorria no grupo controle. A normalização da glicemia pela florizina produzia correção destas anormalidades. Concluíram que a hiperglicemia crônica gera defeitos na secreção de insulina estimulada por glicose e arginina sendo que estas alterações podem ser revertidas pela correção da hiperglicemia.

Usando o modelo de diabetes por estreptozotocina neonatal, TSUJI e colaboradores⁽⁸⁰⁾ estudaram a secreção *in vitro* de ilhotas isoladas e perceberam menor resposta da insulina à glicose mas resposta normal à arginina. Neste estudo não se testou a secreção pós glicose e arginina simultâneas. Também é interessante lembrar que neste caso a secreção foi avaliada em ilhotas de ratos que receberam a estreptozotocina com 1,5 dia de vida e que, com 10 semanas de vida, desenvolveram intolerância à glicose no teste de sobrecarga oral e tinham glicemia de jejum iguais aos controles. A insulina plasmática destes animais era semelhante aos ratos normais. No mesmo estudo, outro grupo de ratos recebeu a estreptozotocina com 5 dias de vida e desenvolveram hiperglicemia de jejum além de insulinopenia plasmática detectada no teste de tolerância oral à glicose. Isto sugere que o defeito na secreção de insulina é proporcional a intensidade da hiperglicemia mantida.

KERGOAT e col.⁽³⁷⁾ e GRILL e col.⁽³⁰⁾ também documentaram a supressão da secreção de insulina pós glicose em modelos de ratos tratados com estreptozotocina neonatal enquanto que a resposta a outros estímulos como acetilcolina, isoproterenol, tolbutamida, arginina e leucina permanece presente e é até potencializada. Quando os

ratos receberam insulina para normalizar a glicemia *in vivo*, ou a concentração de glicose no líquido perfundido *in vitro* era diminuída, a resposta deficiente da insulina à glicose era restaurada, enquanto que a resposta aos outros estímulos retornava aos níveis normais.

O mecanismo envolvido no desenvolvimento da alteração na secreção de insulina induzida pela glicose não está totalmente elucidado e várias possibilidades têm sido aventadas.

Em 1989, PURRELLO e colaboradores⁽⁶⁰⁾ estudaram ilhotas de ratos isoladas bem como células beta purificadas que eram mantidas em cultura em meio de alta concentração de glicose. Relataram as mesmas observações dos estudos anteriores com relação à secreção de insulina estimulada por glicose e outros secretagogos. Também observaram que as alterações dependiam do tempo de exposição das ilhotas ou células beta isoladas às altas concentrações de glicose. O tempo mínimo para causar alteração foi de 12 horas se tornando o defeito mais evidente até 24 horas de exposição. Não houve diferença com tempos maiores que 24 horas. Os autores propuseram a hipótese de que a alta concentração de glicose produzia reações de glicosilação intracelular, afetando o mecanismo de transporte de proteínas secretórias o que provocaria defeito na liberação da insulina. Para se avaliar o papel da glicosilação foram adicionados ao meio de cultura drogas inibidoras dos processos de glicosilação como a Tunicamicina. Com estas drogas preveniu-se o defeito de secreção da insulina induzido pela alta concentração de glicose.

ROBERTSON,⁽⁶⁶⁾ em sua revisão, concluiu que a dessensibilização da célula beta ocorria por defeito no reconhecimento da glicose pela célula e que isto não era causado diretamente pela glicose já que podia ser restaurado com manobras farmacológicas mesmo na presença de hiperglicemia.

Em estudo *in vivo* com ratos hiperglicêmicos por infusão de glicose, SAKO e GRILL⁽⁶⁹⁾ demonstraram que a infusão de diazóxido durante o período de hiperglicemia prevenia o defeito de secreção de insulina. O diazóxido age inibindo a liberação de insulina por ação nos canais de potássio e hiperpolarizando a membrana

celular. Verificaram que o conteúdo de insulina intracelular não se modificava e, portanto, o mecanismo envolvido não seria o de poupar insulina. Uma alternativa para explicar o efeito do diazóxido seria a prevenção da exaustão do processo de secreção por regular o potencial de membrana e o fluxo de cálcio e potássio. Por outro lado, também verificou-se que a infusão de insulina exógena durante a infusão do diazóxido anulava o efeito protetor da droga. Portanto, o hiperinsulinismo seria a causa do defeito de secreção da insulina.

Evidências prévias já indicavam que a exposição da célula beta a altas concentrações de insulina inibiria várias etapas da utilização da glicose pela célula. Isto ocorreria por ligação da insulina em receptor específico na membrana da célula beta.⁽⁸³⁾

Outros estudos em modelos animais de diabetes têm mostrado que a menor secreção de insulina induzida pela exposição crônica à glicose está relacionada com diminuição da expressão do transportador de glicose na célula beta (GLUT 2).

THORENS e colaboradores⁽⁷⁹⁾ demonstraram, em ratos geneticamente diabéticos db/db, usando a técnica de perfusão pancreática, que a secreção basal de insulina era elevada mas não havia resposta à estimulação com glicose. A resposta à arginina continuava normal. Analisando as células beta com imunofluorescência detectaram diminuição nos GLUT 2. Quando as ilhotas dos ratos db/db eram transportadas para ratos não diabéticos os níveis de GLUT 2 retornavam ao normal nestas ilhotas. Inversamente, quando ilhotas de ratos normais eram transplantadas para ratos db/db havia inibição na expressão dos GLUT 2. Sugeriu-se que a perda da expressão dos transportadores de glicose era ocasionada pelo estado de diabetes.

O mecanismo real da supressão dos GLUT 2 não está esclarecido já que a hiperglicemia induzida por infusão contínua de glicose *in vivo* produziu aumento na expressão dos GLUT 2.⁽⁵⁴⁾

Outra possível causa para o defeito na secreção de insulina foi sugerida por ZAWALICH e col.,⁽⁸⁸⁾ ao demonstrarem que a hiperglicemia mantida diminui a

hidrólise dos fosfoinosítídeos da membrana celular que, como discutido anteriormente, é uma etapa importante no mecanismo de secreção de insulina estimulada pela glicose.

Em 1992, OKAMOTO e colaboradores⁽⁵³⁾ propuseram que a inabilidade da glicose em aumentar o influxo de cálcio intracelular seria a responsável pela menor secreção de insulina em células beta de ilhotas cultivadas com alta concentração de glicose. Como causa para o menor influxo de cálcio sugeriu-se a alta concentração de insulina extracelular, diminuição na hidrólise dos fosfoinosítídeos da membrana celular ou despolarização da membrana pelo estímulo contínuo.

A atividade da glucoquinase, enzima que inicia o metabolismo intracelular da glicose gerando glicose-6-fosfato, também tem sido apontada como sendo o sensor que controla a secreção de insulina. CHEN e col.⁽¹³⁾ demonstraram em ilhotas isoladas de ratos hiperglicêmicos por infusão de glicose que a atividade da enzima encontra-se aumentada em paralelo à maior secreção de insulina. As ilhotas puderam ser estimuladas até a concentração de 8,3 mM de glicose, sendo que estímulos maiores não provocaram maior secreção de insulina, embora aumentasse a atividade da glucoquinase. O fato foi interpretado como evidência de que outro mecanismo que não o metabolismo intracelular da glicose estabelecia o limite máximo na secreção de insulina.

Ainda em relação à glucoquinase, demonstrou-se que há relação direta entre o número de receptores de glicose na célula beta e a atividade da enzima. Células de tumores de células beta apresentam aumento na atividade da glucoquinase quando recebem GLUT 2 transferidos de outras células.⁽²³⁾

Em 1994, ROBERTSON e colaboradores⁽⁶⁷⁾ mantiveram clones de células beta (HIT-T 15 cell) em cultura por longos períodos e verificaram que, mantendo-se estímulo prolongado com altos níveis de glicose por mais de seis meses, houve diminuição na produção de insulina concomitante a menor expressão do seu gene. Classificaram este fenômeno como um efeito paradoxal pois já havia sido demonstrado anteriormente que agudamente os níveis de glicose são proporcionais à expressão do gene da insulina.⁽⁵⁷⁾ Sugeriu-se ser a glicosilação de proteínas promotoras

da expressão do gene a causa deste fenômeno e isto seria um processo irreversível. Os autores propuseram a diferença entre o fenômeno de glucotoxicidade, que seria definitivo, e fenômeno de dessensibilização que seria reversível e ocorreria quando a célula beta fosse exposta à hiperglicemia por intervalos menores. No último caso, a causa do defeito provavelmente estaria no aparelho de secreção da insulina, sem envolvimento da síntese hormonal.

Várias possibilidades têm sido propostas como causa da menor secreção de insulina secundária à hiperglicemia. Embora a maioria dos estudos sejam conduzidos em ilhotas pancreáticas de ratos, já se demonstrou que o mesmo defeito ocorre em ilhotas humanas.⁽¹⁵⁾ Portanto, o fenômeno de dessensibilização da célula beta ou toxicidade da glicose deve ser lembrado como fator importante na fisiopatologia do Diabetes Mellitus.

3.7 ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

Distintos métodos têm sido propostos para o isolamento de ilhotas pancreáticas, quer para estudos *in vitro* ou transplantes. As duas principais maneiras para se obter o isolamento são a dispersão mecânica do tecido pancreático ou digestão enzimática para remoção do tecido exócrino e estrutural. As técnicas mecânicas de dispersão têm a vantagem de evitar o contato das ilhotas com substâncias potencialmente tóxicas, mas a separação do tecido exócrino não é completa, o que dificulta o isolamento. O uso da enzima collagenase permite melhor separação das ilhotas dos demais tecidos do pâncreas de forma pouco traumática, facilitando a posterior purificação do tecido isolado.⁽²⁷⁾

Na década de 60, LACY e HELLERSTRON^(41, 33) descreveram as técnicas de microdissecção de pâncreas de roedores para estudo anatômico e histoquímico de ilhotas de Langerhans. Contudo, com estas técnicas, o número de ilhotas obtidas era limitado. Tornou-se então necessário outras formas de isolamento mais efetivas para se conseguir quantidade maior de ilhotas viáveis para estudos funcionais e transplante.

Em 1965, MOSKALEWSKI introduziu o uso da enzima collagenase na digestão do pâncreas de cobaias para separação das ilhotas que posteriormente eram coletadas individualmente com o uso de um microscópio de dissecação.⁽⁵¹⁾

A collagenase comercial é obtida de *Clostridium histolyticum* e tem diferentes potências de digestão dependendo do lote. Isto ocorre pela impureza da enzima com presença de outras substâncias como proteases que interferem no processo de digestão do colágeno.⁽⁵⁰⁾ Na verdade, a collagenase comercial é uma mistura de várias collagenases com especificidades diferentes.^(6, 82) A atividade da enzima também varia de acordo com a temperatura e concentração de cálcio no meio de digestão.⁽¹⁹⁾ Esta variação na atividade da enzima é responsável pela grande diferença dos resultados no isolamento de ilhotas.⁽⁸⁶⁾

Em 1967, LACY e KOSTIANOVSKY⁽⁴²⁾ aperfeiçoaram o método de digestão enzimática do pâncreas de ratos em estudo que se tornou clássico. Os autores desenvolveram a técnica que consistia na injeção de solução salina de Hanks no ducto biliar comum. Como no rato o pâncreas drena diretamente no ducto biliar, a injeção provocava distensão e ruptura do parênquima acinar. Em seguida, o pâncreas era removido e cortado em pequenas porções para ser incubado com a collagenase. Depois da fase de digestão, o material era lavado com solução de Hanks gelada para interromper a atividade da enzima. As ilhotas eram separadas por sedimentação e o material sobrenadante desprezado. Também desenvolveu-se o método de centrifugação do material digerido em gradientes de sacarose para separar as ilhotas. Com esta técnica conseguia-se entre 200 e 300 ilhotas isoladas por pâncreas. A viabilidade das ilhotas foi comprovada pelo estudo de secreção *in vitro* de insulina após incubação das ilhotas em frascos com concentrações estimulatórias de glicose.

Na década de 70 o processo de digestão do pâncreas com collagenase foi aprimorado com técnicas mecânicas de agitação do material na fase de digestão ou com sistemas de filtração para separar o tecido digerido. Com estas alterações aumentou-se o número de ilhotas isoladas por pâncreas para 300 a 400.^(10, 73)

Nos anos 80, a técnica original de LACY e KOSTIANOVSKY foi modificada com a injeção intraductal de colagenase diluída na solução de Hanks. Com isto, se evitava a digestão indiscriminada do tecido acinar e componentes das ilhotas causada pela incubação prolongada dos fragmentos pancreáticos com a colagenase.⁽²⁵⁾

Com a técnica da colagenase intraductal, também é possível se obter maior número de ilhotas viáveis chegando entre 500 e 800 por pâncreas de rato adulto.⁽⁷⁵⁾ Com a centrifugação do material digerido em gradiente de dextran ou ficol conseguiu-se até 1100 ilhotas por pâncreas,⁽⁸¹⁾ sendo que o número total de ilhotas em um rato adulto varia de 3300 a 6000.⁽³⁴⁾

O método da colagenase intraductal é mais eficiente porque a colagenase parece atingir os espaços intersticiais do pâncreas de forma mais efetiva do que quando se usa a técnica original.⁽³²⁾

Esta metodologia de isolamento de ilhotas também obteve sucesso com pâncreas de porcos,⁽⁶³⁾ cães,^(35, 84) macacos⁽²⁸⁾ e de humanos.^(26, 71)

Atualmente já se dispõe de métodos automatizados para o isolamento de ilhotas pancreáticas utilizando a colagenase. Com isto se consegue um número suficiente de ilhotas para transplantes a partir de um único doador.^(64, 76)

4 MATERIAL E MÉTODO

A fase experimental do presente estudo foi realizada no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

No manejo dos animais seguiram-se as recomendações éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 25 ratos Wistar, recém-nascidos, obtidos do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

Os animais foram mantidos juntos das mães até o desmame e posteriormente separados em grupos de até quatro ratos de acordo com o sexo. Cada grupo foi mantido em gaiola padrão e alimentado com ração apropriada para a espécie (NUVITAL®) e água *ad libitum*. As gaiolas ficaram em ambiente apropriado com ciclos naturais de iluminação e temperatura média de 23°C.

4.2 INDUÇÃO DE DIABETES COM ESTREPTOZOTOCINA

Com 4 dias de vida, os ratos foram randomizados para receber ou não a injeção intraperitoneal de estreptozotocina (ZANOZAR®) na dose de 90mg/kg para indução do Diabetes.^(8, 58, 80) No total, 13 ratos, sendo 7 machos e 6 fêmeas, receberam a droga e 12 animais, 4 machos e 8 fêmeas, formaram o grupo controle que foi inoculado com soro fisiológico também pela via intraperitoneal em volume compatível ao peso, estabelecido pela dose de estreptozotocina (tabela A.1 em anexo). Utilizou-se seringa de 0,5 ml com agulha 13/4,5mm.

A estreptozotocina foi ressuspensa em solução fisiológica e posteriormente diluída à concentração de uso de 10,526 mg/ml em tampão citrato⁽⁴⁷⁾ (tabela A.2 em anexo).

4.3 ACOMPANHAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DOS ANIMAIS

O desenvolvimento dos ratos tratados e controles foi acompanhado e a partir da 5ª semana de vida, foram submetidos a pesagens semanais em balança eletrônica (HELMAC®).

A partir da 6ª semana foi dosada semanalmente a glicemia em estado alimentado de todos os ratos. Na 8ª semana, além da glicemia em estado alimentado, foi dosada a glicemia após jejum de 12 horas.

4.4 TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DAS GLICEMIAS

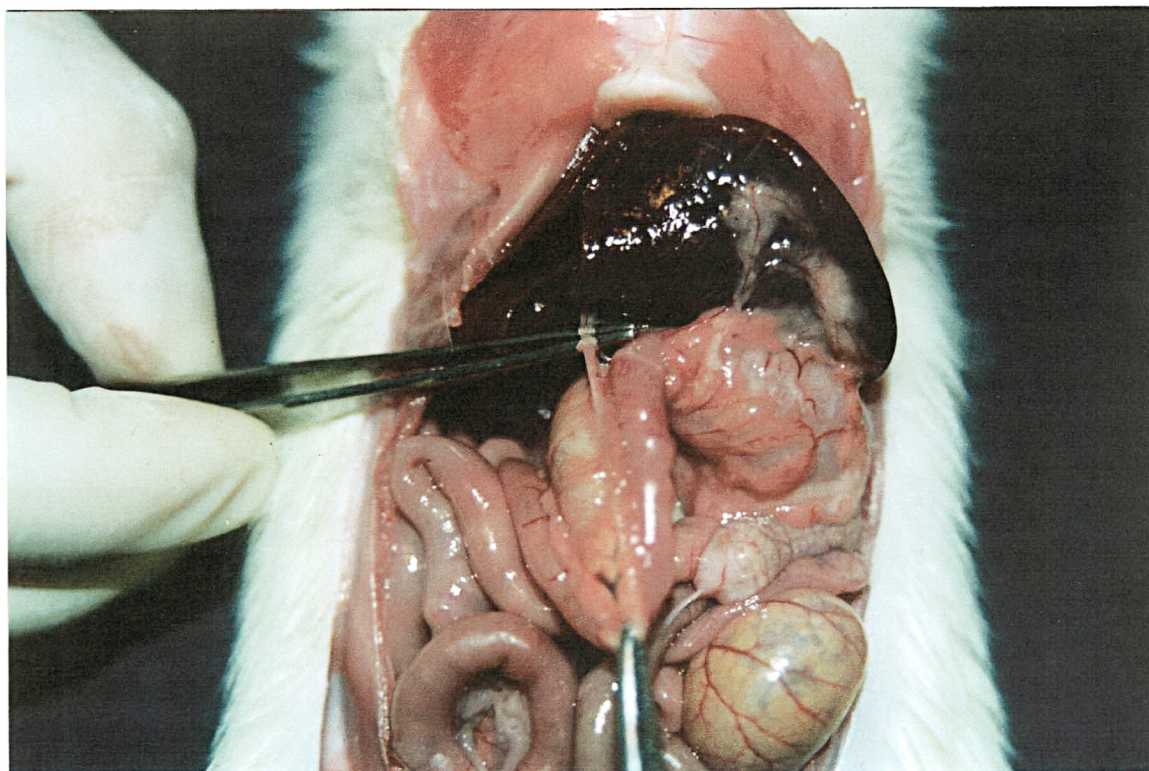
As amostras de sangue para glicemia foram colhidas após amputação de fragmento da ponta da cauda dos animais. Era obtida uma gota de sangue suficiente para determinação da glicemia utilizando uma fita reagente (GLUCOFILM®) e glicosímetro (GLUCOMETER 3®). Este teste é específico para glicose e baseia-se no método da glicose-oxidase, usando a técnica do reagente seco. A glicose-oxidase cataliza a oxidação da glicose sanguínea pelo oxigênio atmosférico, com a produção de ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase, a ortotoluidina reduzida é oxidada pelo peróxido de hidrogênio, produzindo um escurecimento de intensidade proporcional à concentração de glicose presente.

4.5 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Na 8ª semana de vida, os animais foram sacrificados e o pâncreas removido. Para o isolamento das ilhotas, utilizou-se a técnica de injeção de colagenase intraductal modificada. (32, 75, 80, 81)

Os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico (REAGEN®) e submetidos à tricotomia da região abdominal. Posteriormente procedeu-se laparotomia ampla para facilitar a identificação e evisceração do baço, localização e isolamento do ducto biliar comum (figura 1).

FIGURA 1- IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DO DUCTO BILIAR COMUM



Após identificado, o ducto biliar foi clampeado na sua porção distal junto ao duodeno com pinça hemostática. Mais próximo ao hilo hepático, o ducto foi seccionado parcialmente com tesoura de Íris. Após a abertura, foi introduzido um catéter de para punção venosa de recém-nascidos (Intracath[®] n 22) e amarrado com fio de nylon 000.

Seguido à canulação do ducto biliar, os animais foram sacrificados por indução de pneumotórax.

A collagenase foi injetada diretamente no ducto biliar diluída em 10 ml de solução de Hanks na concentração de 1,5 mg/ml (tabela A.3 em anexo). Após a distensão do tecido pancreático, realizou-se a pancreatectomia iniciando-se pela porção junto ao baço (figuras 2 e 3).

FIGURA 2 - DISTENÇÃO DO TECIDO PANCREÁTICO APÓS A INJEÇÃO INTRADUCTAL DA SOLUÇÃO DE HANKS COM COLAGENASE

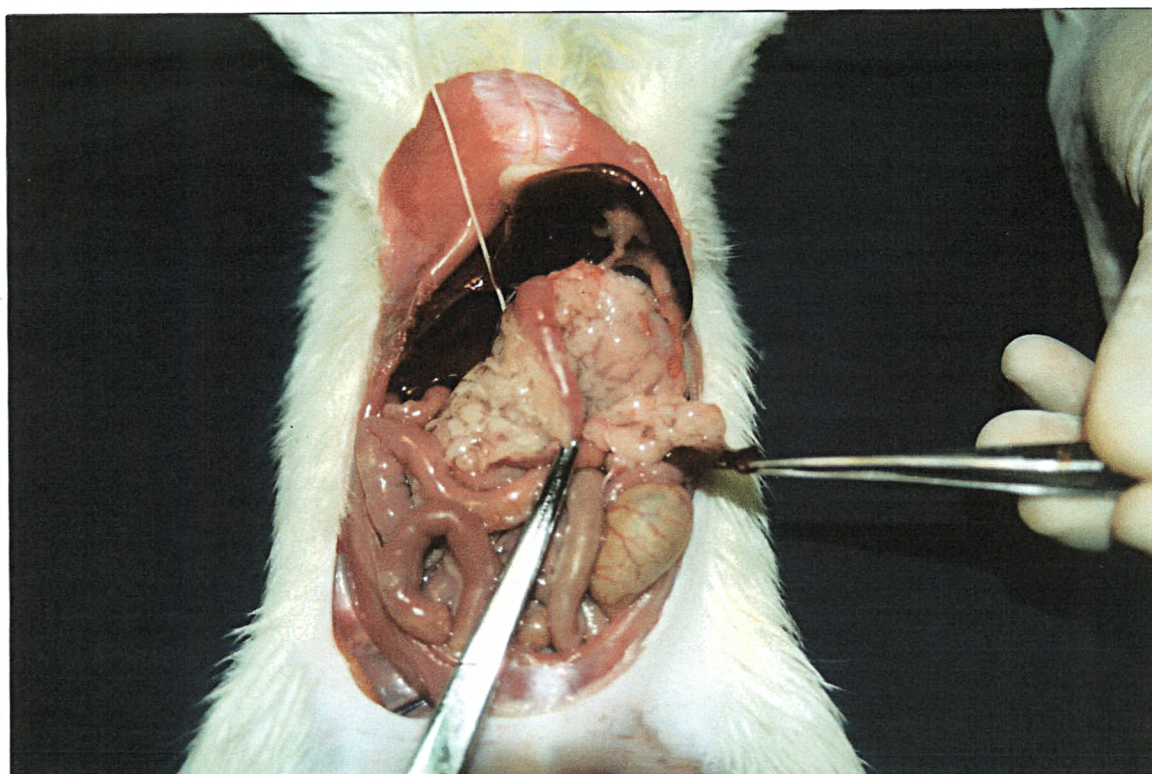
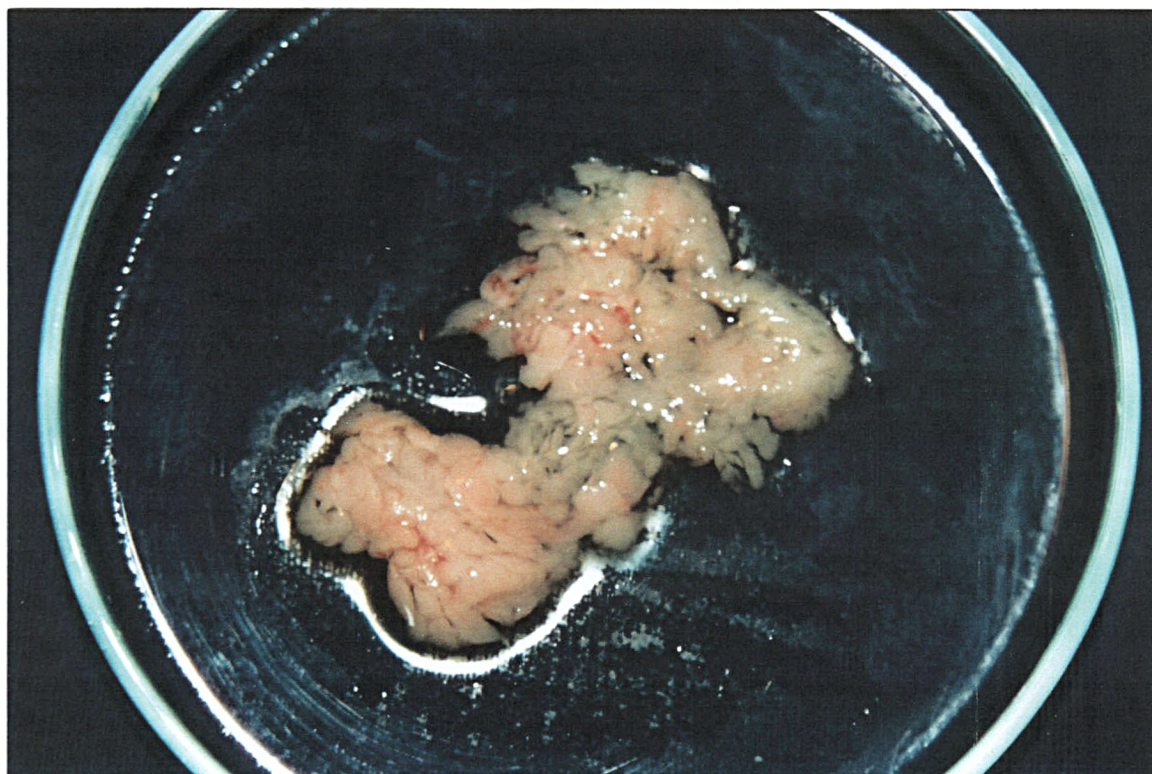


FIGURA 3 - ASPECTO DO PÂNCREAS APÓS A REMOÇÃO



4.6 TÉCNICA PARA O PREPARO DA COLAGENASE

Utilizou-se colagenase tipo V (SIGMA®C - 9263), atividade de digestão 268 U/mg na dose de 1,5 mg/ml de solução de Hanks. A colagenase foi pesada imediatamente antes do procedimento em balança de precisão (METTLER®) e dissolvida na solução de Hanks usando agitador magnético.

4.7 TÉCNICA PARA O PROCESSO DE DIGESTÃO

Depois de removido, o pâncreas foi colocado em placa de Petri e mantido em Banho-Maria (FANEN®) a 37°C para digestão estática. Sobre a placa foi colocada uma caixa plástica com atmosfera de mistura carbogênica. O tempo para digestão foi de 40 minutos.

4.8 TÉCNICA PARA SEPARAÇÃO DAS ILHOTAS

Após terminada a fase de digestão, o material foi transferido para Becker e lavado com 10 ml de solução de Hanks gelada para parar a digestão. A seguir o material foi depositado em tubo plástico de fundo cônico e agitado em agitador automático de tubos (PHOENIX®) por 10 segundos. Após a agitação, o tubo foi centrifugado em centrífuga clínica (FANEN® mod. 206 R) por 15 segundos a 1000 rpm.

O sobrenadante foi removido com pipeta tipo Pasteur e descartado. O sedimento foi novamente transferido para Becker e lavado com solução de Hanks gelada por 8 vezes. A cada lavagem, 5 ml de solução de Hanks foi adicionada e após 1 minuto de sedimentação o sobrenadante foi descartado usando a pipeta de Pasteur. Desta forma separou-se as ilhotas do tecido acinar digerido por sedimentação.

Após as lavagens, a suspensão celular obtida foi filtrada em um filtro de malha de nylon de 500 μ (TEGAPE®) para remoção das partículas maiores e o filtrado foi transferido para placas de Petri com solução de Krebs (tabela A.4 em anexo)) suplementada com albumina bovina 0,25% (SIGMA® A-4503 Fração 5) e observado em lupa com magnificação de 10 vezes (OLYMPUS®).

Com o auxílio da lupa, as ilhotas foram facilmente identificadas e coletadas por pipeta automática de 100 µL (GILSON®) com ponteira plástica e removidas para os tubos de incubação ou coloração com Azul de Tripán.

O processo de isolamento foi concluído nos 13 animais tratados com estreptozotocina e em 10 do grupo controle. Em 2 animais deste grupo houve ruptura do ducto biliar durante a canulação, não sendo possível o isolamento das ilhotas.

4.9 TÉCNICA PARA COLORAÇÃO COM AZUL DE TRIPAN

As ilhotas foram transferidas em grupos de 5 para placa escavada de vidro tipo KAHN onde se procedeu a coloração com Azul de Tripán (VETEC®) a fim de se avaliar a viabilidade das células. O corante foi diluído a 0,5% em solução de Hanks e adicionado em igual volume da suspensão celular. Após 1 minuto observou-se, com o auxílio de lupa, se houve ou não coloração das células. O aparecimento de cor azul nas ilhotas é indicador de dano celular com perda da integridade da membrana da célula.⁽¹⁷⁾ A viabilidade das ilhotas foi determinada por amostragem. Para cada pâncreas utilizou-se 25 ilhotas.

4.10 TÉCNICA PARA A CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE ILHOTAS

Após a separação das ilhotas, para a coloração com Azul de Tripán ou incubação, o material restante foi dividido em pequenos volumes depositados sobre placas de Petri e analisado na lupa para contagem do número total de ilhotas obtido de cada pâncreas.

4.11 INCUBAÇÃO DAS ILHOTAS

As ilhotas isoladas foram transferidas com a pipeta automática para criotubos plásticos (CORNING®) em grupos de 5 junto com 1 ml da solução de Krebs e glicose. Para cada animal do experimento foram utilizados 4 grupos de ilhotas, 2 grupos mantidos com 5,6 mM de glicose e 2 grupos com 16,7 mM de glicose. Os tubos foram

mantidos em Banho-Maria a 37°C por 30 minutos em atmosfera de mistura carbogênica. Este experimento visou estimular a secreção de insulina quando as ilhotas foram mantidas com concentração estimulatória de glicose.^(42, 80)

Após o período de incubação de 30 minutos, amostras de 200 µl do meio foram separadas com pipeta automática e congeladas a -20°C para posterior determinação da concentração de insulina. Para cada animal utilizou-se um tubo de cada concentração de glicose para determinação da insulina. O outro tubo ficou armazenado para eventual necessidade de repetição da dosagem.

4.12 DOSAGEM DA INSULINA

A dosagem da insulina no meio de incubação das ilhotas foi feita por radioimunoensaio usando um *kit* comercial (MICROMEDIC®) e um contador gama automático (DPC®). Na técnica do radioimunoensaio, um antígeno exógeno radiomarcado compete com o antígeno endógeno a ser dosado por sítios de ligação de um anticorpo preparado especialmente. No *kit* empregado existem tubos que contêm anticorpos antiinsulina produzidos em cobaias. Durante o teste, insulina porcina marcada com iodo radiativo e a amostra a ser dosada são incubadas nestes tubos. Depois do período de incubação, o tubo é lavado para se retirar a insulina não ligada aos anticorpos. A quantidade de insulina radiativa capturada no tubo é determinada pelo contador gama e é inversamente proporcional a quantidade de insulina presente na amostra estudada. A concentração de insulina ligada aos anticorpos é então comparada com os padrões que contêm quantidades conhecidas de insulina e então calcula-se a concentração de insulina na amostra analisada.

Os resultados da dosagem de insulina são expressados em µU/ml e a sensibilidade do ensaio é de 1,0 µU/ml. A atividade relativa do método é de 1,0 para insulina humana e de 0,895 para insulina de rato. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator 1,105 para compensar esta diferença.

Todas as dosagens de insulina foram feitas em duplicata utilizando-se a média dos dois ensaios como resultado final. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,4%.

Procedimentos do radioimunoensaio:

- 1) 100 µl de cada calibrador, controles e amostras foram adicionados em seus respectivos tubos;
- 2) 900 µl do traçador (125 Insulina) foi adicionado em todos os tubos;
- 3) os tubos foram agitados e incubados em temperatura ambiente por 18 horas;
- 4) todos os tubos foram aspirados e lavados com água deionizada;
- 5) os tubos foram transferidos para o contador gama para a contagem radiativa;
- 6) os resultados foram calculados usando a fórmula indicada e traçando o gráfico;
- 7) cálculo:
 - foram determinadas as médias da contagem por ensaio;
 - as médias da contagem de cada calibrador, controle e amostra foram divididas pela média da contagem do calibrador zero e multiplicadas por 100. Assim determinou-se a %B/B₀;
 - fórmula: $\%B/B_0 = \frac{CPA(\text{ensaio})}{CPA(0\mu U/ml)} \times 100$
 - o gráfico foi construído usando papel logit-log. No eixo y foi anotado a %B/B₀ e no eixo x as concentrações dos calibradores. Unindo-se os pontos obteve-se a curva de calibração;
 - as concentrações de insulina de cada amostra foram determinadas utilizando-se a curva de calibração.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedimentos estatísticos foram utilizados para comparar o grupo de ratos controle com o grupo tratado com estreptozotocina em relação à evolução do peso dos animais, glicemias e dosagens de insulina *in vitro*.

a) Técnica de análise de dados longitudinais (JONES, 1992)

Consiste em ajustar um modelo polinomial que explique satisfatoriamente o comportamento do fenômeno em estudo, ao longo do tempo. Esta metodologia não é prejudicada por dados perdidos e correlação entre observações do mesmo indivíduo. Permite a comparação estatística do modelo ajustado para dois ou mais grupos de indivíduos. Foi utilizada na análise da evolução do peso e glicemia dos animais ao longo das semanas.

b) Teste “t” de Student para comparação de duas amostras dependentes

Testa a significância estatística da diferença das médias das observações e foi utilizada na análise das dosagens de insulina em concentrações não estimulatórias e estimulatórias de glicose dentro de cada grupo de ratos. Foram consideradas as seguintes hipóteses estatísticas:

- H_0 : $D=0$ (não existe diferença entre as dosagens de insulina nas diferentes concentrações de glicose).
- H_1 : $D \neq 0$ (existe diferença entre as dosagens de insulina nas diferentes concentrações de glicose).

A hipótese nula foi rejeitada quando o valor p do teste foi inferior a 0,05.

c) Teste “t” de Student para comparação de duas amostras independentes

Testa a significância estatística da diferença entre as médias de dois grupos (controle e tratado). Foi utilizado na análise das diferenças entre o peso, glicemia e insulina entre os grupos.

As técnicas foram aplicáveis considerando-se que as variáveis do estudo provêm de população normal.

d) Para a análise dos dados, utilizou-se o programa para microcomputador STATISTICA®

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS

O número médio de ilhotas obtidas por pâncreas foi de 490, variando de 128 a 819. A viabilidade das ilhotas por amostragem com coloração de Azul de Tripan foi de 100% com exceção de um experimento em que se detectou 20% de ilhotas coradas, havendo portanto 80% de ilhotas viáveis neste caso.

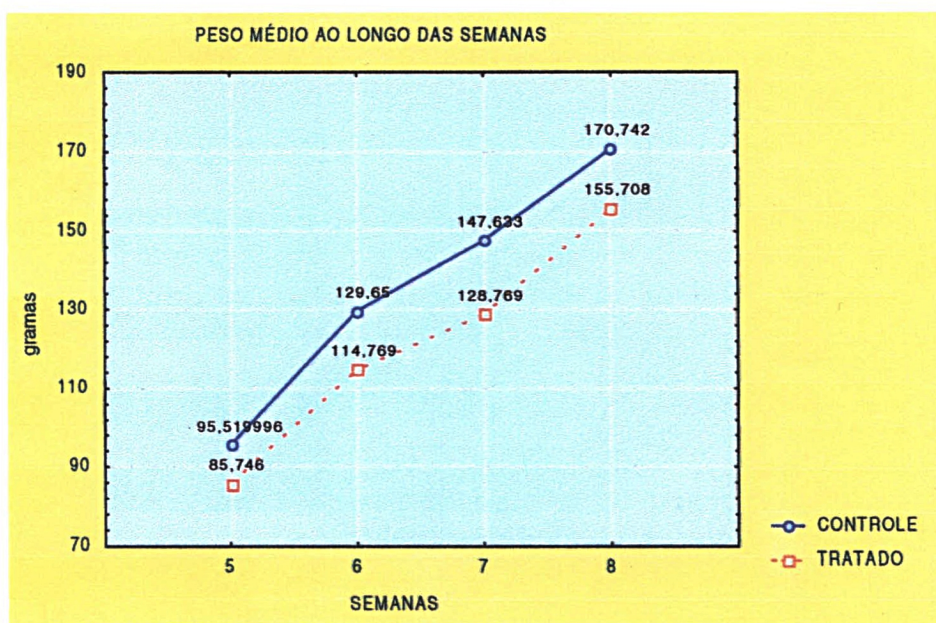
5.2 PESO DOS ANIMAIS

Comparando-se as médias semanais dos pesos dos animais entre os dois grupos, observou-se diferença significativa na 5ª, 6ª e 7ª semanas (tabela 1 e figura 4).

TABELA 1- EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

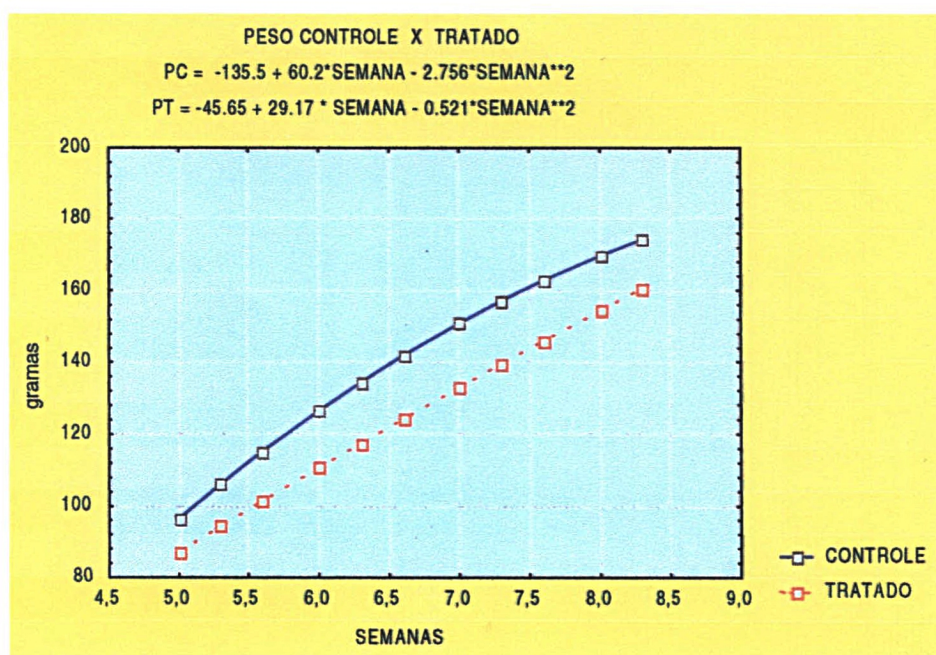
	n	MÉDIA PESO (g)	DESVIO PADRÃO	VALOR p
5ª Semana				
Controles	12	95,52	7,91	
Tratados	13	85,75	6,34	0,002341
6ª Semana				
Controles	12	129,65	12,10	
Tratados	13	114,77	9,70	0,002446
7ª Semana				
Controles	12	147,63	17,43	
Tratados	13	128,77	15,74	0,009193
8ª Semana				
Controles	12	170,74	25,34	
Tratados	13	155,70	14,47	0,078669

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS



Aplicando-se a metodologia de dados longitudinais, observou-se diferença significativa no peso dos animais embora os dois grupos tenham tido o mesmo comportamento de progressão ao longo do tempo (figura 5).

FIGURA 5 - PROGRESSÃO DO PESO DOS ANIMAIS UTILIZANDO-SE A METODOLOGIA DE DADOS LONGITUDINAIS



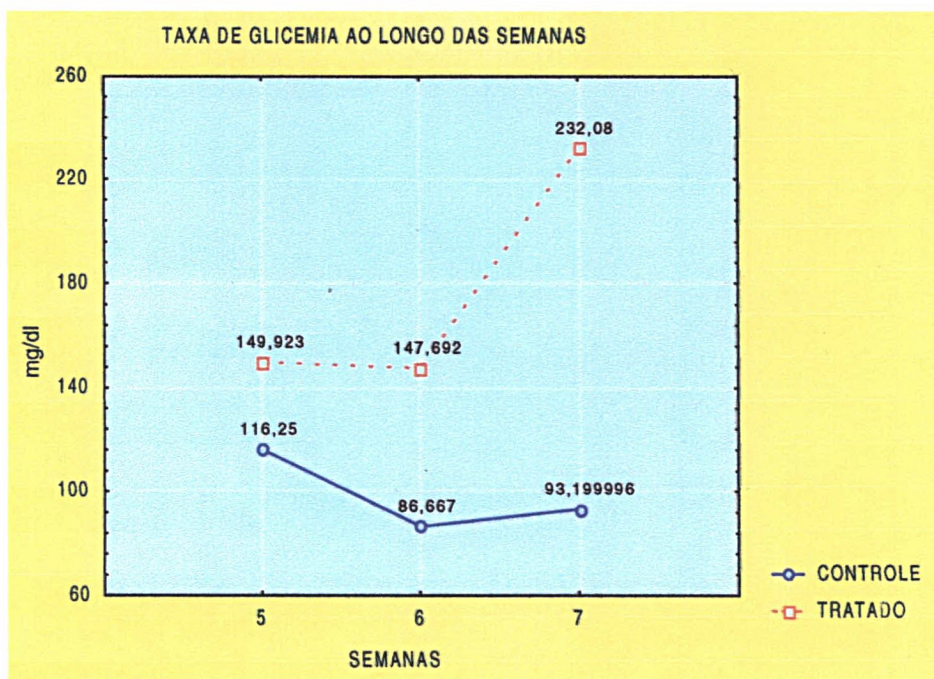
5.3 GLICEMIAS

Observou-se que ao longo das semanas houve diferença significativa entre as glicemias no estado alimentado dos dois grupos (tabela 2 e figura 6).

TABELA 2 - MÉDIAS DAS GLICEMIAS EM ESTADO ALIMENTADO

	n	GLICEMIA (mg/dl)	DESVIO PADRÃO	VALOR p
6ª Semana				
Controles	12	116,25	10,30	
Tratados	13	149,92	34,90	0,003896
7ª Semana				
Controles	12	86,70	15,70	
Tratados	13	147,70	54,97	0,001171
8ª Semana				
Controles	12	93,20	8,32	
Tratados	13	232,08	104,93	0,000138

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EVOLUÇÃO DA GLICEMIA AO LONGO DAS SEMANAS



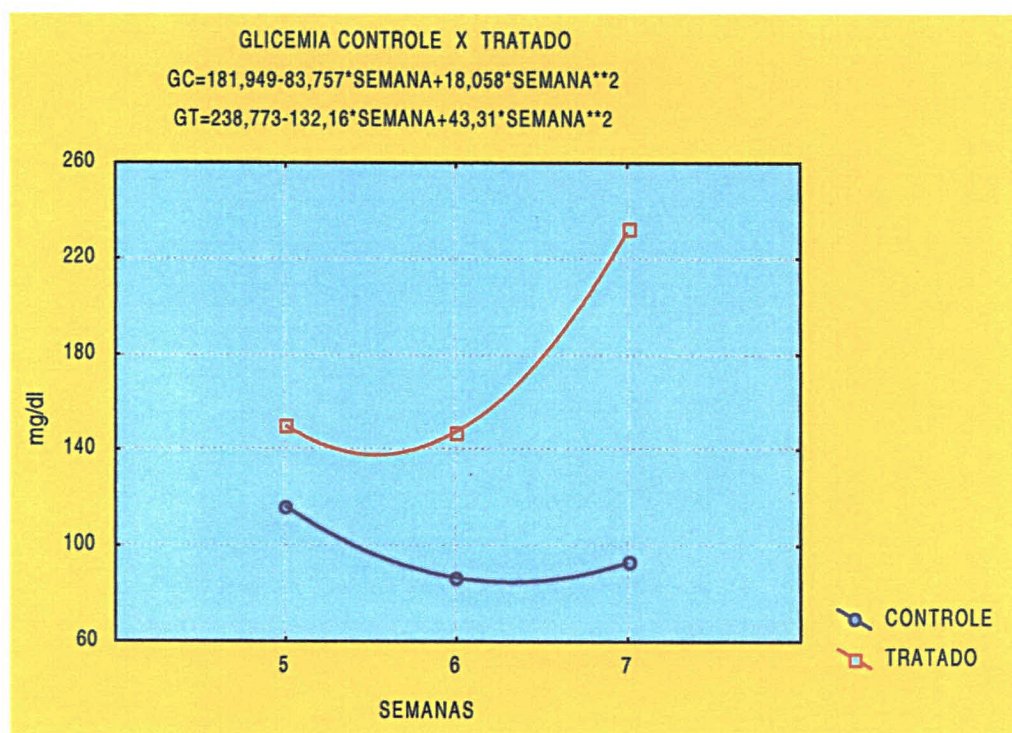
A glicemia em jejum avaliada na 8ª semana não apresentou diferença entre os dois grupos (tabela 3).

TABELA 3 - GLICEMIA EM JEJUM NA 8ª SEMANA

	n	GLICEMIA (mg/dl)	DESVIO PADRÃO	VALOR p
8ª Semana				
Controles	12	59,40	7,60	
Tratados	13	66,80	11,40	0,072835

Utilizando-se a metodologia dos dados longitudinais ajustados para análise das glicemias ao longo das semanas observou-se que a curva do grupo tratado com estreptozotocina mostrou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (figura 7).

FIGURA 7 - EVOLUÇÃO DAS GLICEMIAS UTILIZANDO-SE OS MODELOS AJUSTADOS



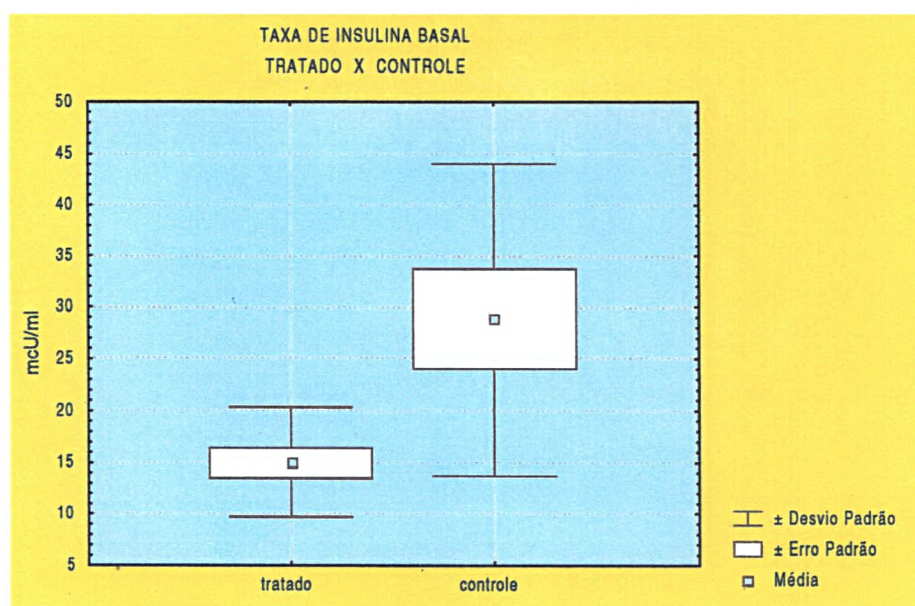
5.4 DOSAGENS DE INSULINA

Comparando-se a dosagem de insulina com concentração não estimulatória de glicose entre os ratos controles e tratados observou-se diferença significativa entre os dois grupos (tabela 4 e figura 8).

TABELA 4 - INSULINA OBTIDA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE

	INSULINA (μ U/ml)	DESVIO PADRÃO	n	P
Controles	28,897	15,15	10	
Tratados	15,016	5,33	13	0,0056

FIGURA 8 - INSULINA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE

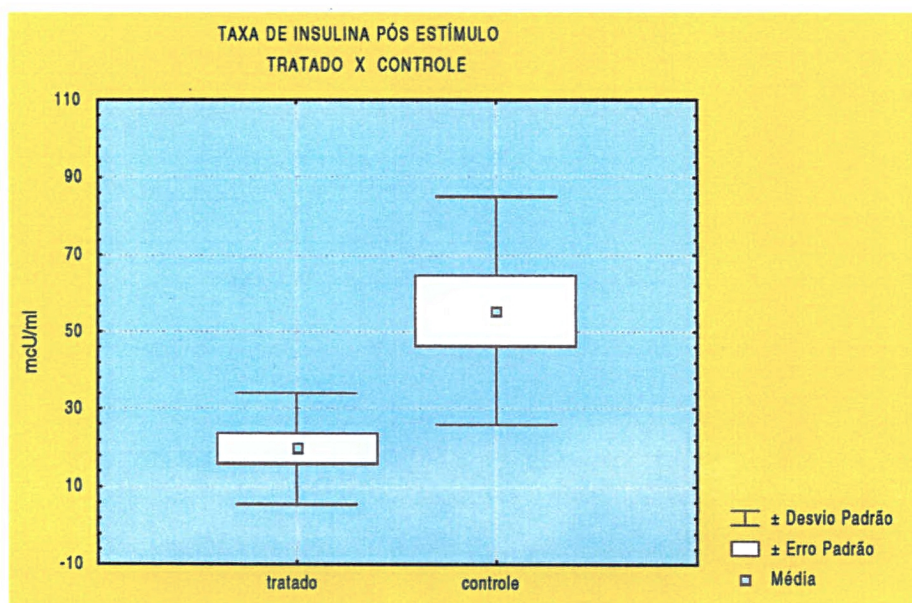


Comparando-se a dosagem de insulina em concentrações estimulatórias de glicose entre os grupos controles e tratados observou-se diferença significativa entre os dois grupos (tabela 5 e figura 9).

TABELA 5 - DOSAGEM DE INSULINA EM CONCENTRAÇÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE

	INSULINA (μ U/ml)	DESVIO PADRÃO	n	P
Controles	55,5	29,65	10	
Tratados	19,81	14,27	13	0,000995

FIGURA 9 - DOSAGEM DE INSULINA EM CONCENTRAÇÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE

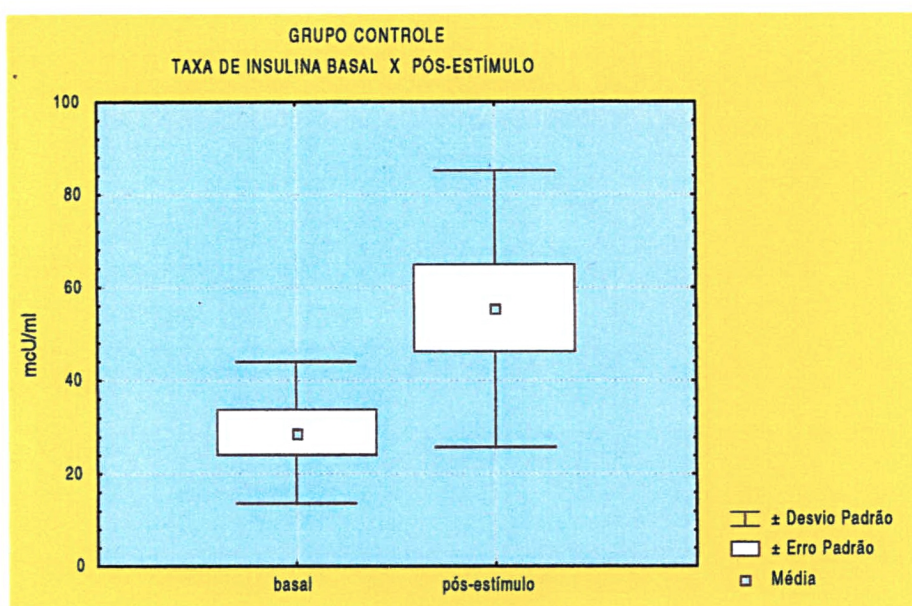


No grupo controle, quando são comparadas as dosagens de insulina em concentração não estimulatória de glicose com a dosagem após estímulo, nota-se diferença significativa entre as médias (tabela 6 e figura 10).

TABELA 6 - INSULINA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA (BASAL) E PÓS ESTÍMULO NO GRUPO CONTROLE

	INSULINA (μ U/ml)	DESVIO PADRÃO	n	P
Basal	28,89700	15,15203	10	
Pós-estímulo	55,49800	29,64544	10	0,011121

FIGURA 10 - DOSAGEM DE INSULINA NO GRUPO CONTROLE EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE E APÓS ESTÍMULO

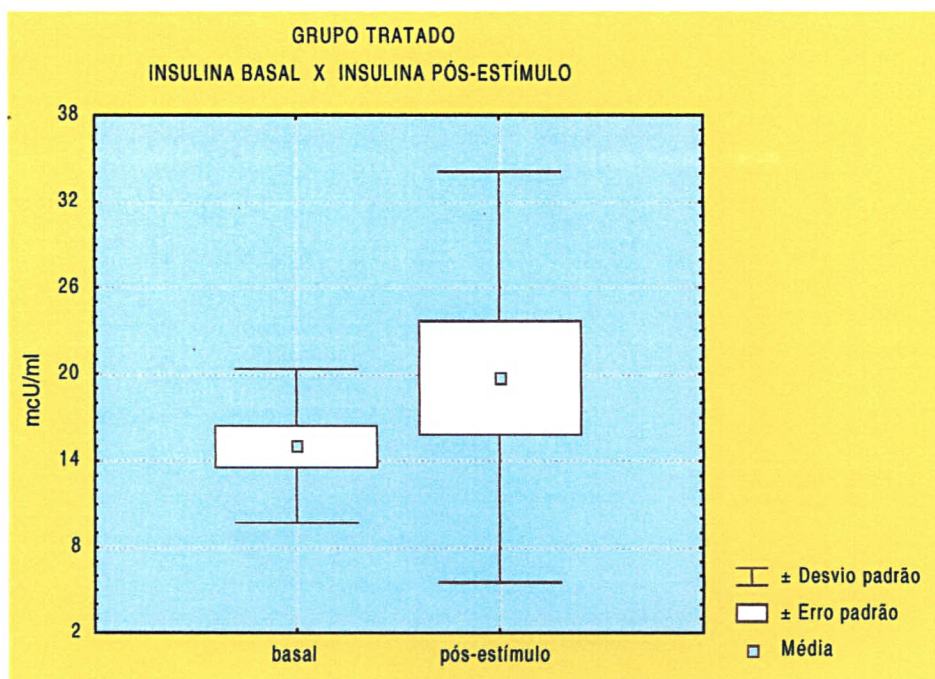


No grupo de ratos tratados com estreptozotocina, quando foram comparadas a dosagem de insulina em concentração não estimulatória de glicose e após o estímulo não houve diferença entre as médias (tabela 7 e figura 11).

TABELA 7 - DOSAGEM DE INSULINA NO GRUPO TRATADO EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE (BASAL) E APÓS ESTÍMULO

	n	INSULINA (μ U/ml)	DESVIO PADRÃO	VALOR p
Basal	13	15,01	5,33	0,204560
Pós-estímulo	13	19,81	14,27	

FIGURA 11 - DOSAGEM DE INSULINA NO GRUPO TRATADO COM ESTREPTOZOTOCINA EM CONCENTRAÇÃO NÃO ESTIMULATÓRIA DE GLICOSE (BASAL) E PÓS ESTÍMULO



6 DISCUSSÃO

O rato diabético por inoculação de estreptozotocina no período neonatal tem sido definido como modelo de Diabetes não insulino-dependente ou do tipo 2. Neste estudo, a injeção da droga no 4º dia de vida dos animais desenvolveu diabetes leve na vida adulta, com glicemias em jejum normais e hiperglicemia no estado alimentado. Como após oito semanas os animais apresentaram glicemia em média maior do que 200 mg%, tornou-se desnecessária a realização do teste de tolerância à glicose. Sabe-se que a intensidade do Diabetes neste modelo é variável de acordo com o dia da injeção da estreptozotocina, sendo mais branda até o 2º dia de vida e mais intensa após.⁽⁸⁰⁾ Esta diferença deve ocorrer pela capacidade de regeneração celular ser maior quanto mais novo for o animal. PORTHA et al.⁽⁵⁸⁾ demonstraram que a injeção de estreptozotocina no período fetal do rato, através da veia vitelínica, não induziu diabetes posteriormente.

Para o sucesso na indução do Diabetes é importante correta preparação da estreptozotocina. Após a droga ser ressuspendida na concentração padrão, as diluições seguintes devem ser feitas em solução tampão citrato para a manutenção do pH na diluição. Sem este cuidado, a atividade da droga é alterada e não se consegue a indução do Diabetes.

O controle dos animais em relação ao peso e as glicemias foi feito após cinco semanas de vida porque já se demonstrou previamente que após esta fase é que se nota o aparecimento do Diabetes.⁽⁸⁾ Foi sugerido que o desenvolvimento puberal e o conseqüente aumento dos esteróides sexuais pudesse desencadear o processo. Outra possibilidade seria o aumento de peso dos animais requisitando maior quantidade de insulina para manter o controle glicêmico.

A diferença de peso entre os grupos de animais foi bastante evidente e o menor peso nos animais tratados com estreptozotocina é proporcional à intensidade do

Diabetes.⁽⁸⁰⁾ Diferença de sexo não explicou este achado já que havia mais ratos machos no grupo tratado do que no grupo controle.

Usando este modelo de rato diabético, GIROIX et al.⁽²⁴⁾ verificaram, na perfusão *in vitro* do pâncreas, menor secreção de insulina após estímulo com a glicose e resposta normal da célula beta à arginina. PORTHA⁽⁵⁸⁾ também demonstrou diminuição na secreção de insulina pós estímulo com glicose em ilhotas isoladas.

No presente estudo, as ilhotas isoladas dos ratos diabéticos mostraram franca diminuição na secreção estimulada de insulina em comparação com as ilhotas dos ratos normais, conforme demonstrado na tabela 5. Como já se demonstrou que neste modelo de Diabetes o número de células beta é desproporcionalmente reduzido em relação à insulina,⁽⁷⁾ é provável que a hiperglicemia mantida tenha causado a supressão na resposta da célula beta à glicose.

O isolamento de ilhotas pancreáticas por digestão enzimática é um método eficiente mas com reprodução variável. Esta ocorrência pôde ser detectada neste estudo, pois o número de ilhotas isoladas de cada pâncreas foi variável, apesar de serem seguidas as mesmas etapas em cada procedimento. Pequenas variações na atividade de digestão da collagenase podem explicar estas diferenças já que a collagenase comercial não é pura.^(70, 86) Também é possível que a fase de injeção da collagenase intraductal tenha sofrido variações entre cada procedimento, alterando a concentração da enzima nos diversos segmentos do tecido pancreático. Observou-se que se a canulação do ducto biliar não for feita na sua porção mais proximal, junto ao hilo hepático, a distensão da porção distal do pâncreas próxima ao baço não é completa, interferindo desta forma na quantidade de ilhotas isoladas.

O tempo de digestão enzimática ideal para o melhor isolamento das ilhotas pancreáticas é variável dependendo da atividade da enzima e sua concentração. Neste estudo adotou-se o tempo de digestão de 40 minutos após vários experimentos prévios até se chegar ao ponto de se obter o maior número de ilhotas viáveis.

A injeção intraductal de colagenase implementa o processo de digestão e tem sido o método mais usado no isolamento de ilhotas de ratos para estudos funcionais ou transplantes.

As ilhotas isoladas apresentaram alto índice de viabilidade comprovado pela coloração de Azul de Tripan bem como pela secreção de insulina *in vitro* (tabelas 4 e 5).

Como o tamanho de cada ilhota é bastante variável, no momento de transportá-las aos tubos de incubação, procurou-se seleccionar ilhotas de dimensões semelhantes para que a diferença no número de células beta não interferisse na variação da secreção de insulina.

A dosagem da insulina foi facilitada com o uso de um *kit* comercial para radioimunoensaio já padronizado para dosagem de insulina de rato e que apresenta sensibilidade previamente definida.

De modo geral conseguiu-se adaptar a técnica de isolamento de ilhotas às condições e local disponível a fim de se atingir os objetivos propostos.

7 CONCLUSÕES

O modelo de diabetes tipo 2 por injeção de estreptozotocina no período neonatal de ratos foi conseguido com a diluição da droga à concentração de 90 mg/kg de peso.

A técnica de isolamento de ilhotas pancreáticas de ratos por digestão com colagenase foi reproduzida adaptando-se a concentração da enzima em 1,5 mg/ml e o tempo de digestão em 40 minutos.

A secreção de insulina *in vitro* pelas ilhotas isoladas, após estímulo com glicose, mostrou-se francamente suprimida nos ratos diabéticos sugerindo que a hiperglicemia crônica tenha produzido alterações nas células beta.

ANEXOS

TABELA A.1. - DOSE DE ESTREPTOZOTOCINA

Rato	Peso (g)	Volume Inoculado (ml)
1.	10,2	0,09
2.	11,0	0,09
3.	10,5	0,09
4.	10,8	0,10
5.	10,2	0,09
6.	10,7	0,09
7.	12,2	0,10
8.	12,8	0,11
9.	10,9	0,06
10.	10,6	0,09
11.	10,5	0,09
12.	10,7	0,09
13.	9,5	0,08

TABELA A.2. - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO CITRATO ⁽⁴⁷⁾

Solução Ácida (A)	0,1Molar Ácido Cítrico
Solução Básica (B)	0,1Molar Citrato de Sódio
Preparação pH 4,0 :	
<ul style="list-style-type: none"> • 66ml de Solução A + 59ml da Solução B • Ajustar pH em Potenciômetro 	

TABELA A.3. - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE HANKS ⁽⁴⁹⁾

Componentes	Concentração (Milimolar)
NaCl (Merck®)	137
KCl (Merck®)	5
CaCl ₂ (Merck®)	1
MgSO ₄ (Merck®)	1
Na ₂ HPO ₄ (Merck®)	0,3
KH ₂ PO ₄ (Merck®)	0,4
NaHCO ₃ (Merck®)	4

A solução foi equilibrada pela vaporização de mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) White-Martins® e o pH corrigido em 7,4 com NaOH ou HCl.

TABELA A.4. - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE KREBS ^(49,73)

Componentes	Concentração (Milimolar)
Solução 1	
NaCl (Merck®)	115
Solução 2	
NaHCO ₃ (Merck®)	24
KCl (Merck®)	5
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Merck®)	1
Solução 3	
CaCl ₂ ·6H ₂ O (Merck®)	2,5

As soluções foram misturadas em partes iguais no momento do uso com mais uma parte de água destilada, Albumina Bovina 0,25% (Sigma® - Fração V) e Glicose (Merck®) 5,6 ou 16,7 Milimolar

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARDUINO, F. **Diabetes**. 3.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1980.
Cap.1: O Diabetes Ontem e Hoje; p.1-3.
- 2 ATKINSON, M.A.; MAGLAREN N.K. The pathogenesis of insulin-dependent Diabetes Mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v.331, n.21, p.1428-1436, 1994.
- 3 BENNET, P.H. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. In: KAHN, C.R. et WEIR, G.C. (eds). **Joslin's Diabetes Mellitus**. 13.ed. Malvern, Pennsylvania : Lea & Febiger, 1994. p.193-215.
- 4 BLISS, M. **The discovery of insulin**. 1.ed. Edinburgh : Paul Harris, 1983.
Cap.1: A long prelude, p.20-33.
- 5 BOLAFFI, J.L.; HELDT, A.; LEWIS, L.D.; GRODSKY, G.M. The third phase of in vitro insulin secretion : evidence for glucose insensitivity. **Diabetes**, v.35, n.3, p.370-373, 1986.
- 6 BOND, M.D.; VAN WART, H.E. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. **Biochemistry**, v.23, p.3085-3091, 1985.
- 7 BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; WEIR, G.C. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. **J. Clin. Invest.**, v.71, n.3, p.1544-1553, 1983.
- 8 BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; HONEY, R.N.; WEIR G.C. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin-limited beta cell regeneration and hyperglycemia. **Diabetes**, v.30, n.1, p.64-69, 1981.
- 9 BONNER-WEIR, S.; ORCI, L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. **Diabetes**, v.31, n.8, p.883- 889, 1982.
- 10 BUITRAGO, A. et al. Rapid isolation of pancreatic islets from collagenase digested pancreas by sedimentation through percoll at unit gravity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.79, p.823-827, 1977.
- 11 BUSNARDO, A.C.; DIDIO, L.J.A.; TIDICK, R.T. et al. History of the pancreas. **Am. J. Surg.**, v.148, n.4, p.539-550, 1983.
- 12 CHABNER, B.A. et al. Antineoplastic agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (eds). **Goodman e Gilman the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9.ed. N. York : McGraw Hill, 1996. p.1233-1242.
- 13 CHEN, C.; BUMBALO, L.; LEAHY, J. L. Increased catalytic activity of glucokinase in isolated islets from hyperinsulinemic rats. **Diabetes**, v.43, n.5, p.684-689, 1994.

- 14 CLARK, A.; BOWN, E.; KING, T. et al. Islet changer induced by hyperglycemia in rats-effect of insulin or chlorpropamide therapy. **Diabetes**, v.31, n.4, p.319-325, 1982.
- 15 DAVALLI, A.M.; RICORDI, C.; SOCCI, C. et al. Abnormal sensitivity to glucose of human islets cultured in high glucose medium - partial reversibility after an additional culture in a normal glucose medium. **J. of Clin. End. Metab.**, v.72, n.1, p.202-208, 1991.
- 16 DAHL-JORGENSEN, K. Effect of a near normoglycemia for two years on progretion of early diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy : The Oslo Study. **Br. Med. J.**, v.293, n.6556, p.1194-1199, 1986.
- 17 DELABY, J. Reproducible high yields of rat islet of Langerhans. **Diabete et Metabolisme**, v.15, n.2, p.123-127, 1989.
- 18 DE FRONZO, R.A.; SIMONSON, D.C. Glucose toxicity. In: MAZZAFERRI, E.L.; BAR, R.S.; KREISBERG, R.A.(eds). **Advances in endocrinology and metabolism**, v.3. Chicago : Mosby Year Book, 1992. p.1-53.
- 19 DONO, K.; GOTOH, M.; MONDEN, M. et al. Low temperature collagenase digestion for islet isolation from 48h cold preserved rat pancreas. **Transplantation**, v.57, n.1, p.22-26, 1994.
- 20 EISENBARTH, G.S. The natural history of type I diabetes. **Diabetes Metab. Rev.**, v.3, n.4, p.873-891. 1987.
- 21 ESCHWEGE, E. Coronary heart disease mortality in relation with diabetes, blood glucose and plasma insulin levels : The Paris Prospective Study. **Horm. Metab. Res.**, 15 (suppl), p.41-46, 1985.
- 22 FAJANS, S.S. Definition and classification of diabetes including maturity onset diabetes of the young. In: LE ROITH, D.; TAYLOR, S.I.; OLEFSKY, J.M. (eds). **Diabetes Mellitus A Fundamental and Clinical Text**. 1.ed. Philadelphia : Lippincott-Reaven, 1996. p.251-260.
- 23 FERBER, S.; JOHNSON, J.; BELTRANDELRIO, H. et al. Glucose sensing in GLUT 2 and glucokinase transfected RIN cells. **Diabetes**, v.42 (suppl.1), p.11, 1993.
- 24 GIROIX, M.H.; PORTHA, B.; KERGOAT, M. et al. Glucose insensitivity and aminoacid hypersensitivity of insulin release in rats with NIDDM : a study with the perfused pancreas. **Diabetes**, v.33, n.5, p.667-673, 1985.
- 25 GOTOH, M.; MAKI, T.; KIYOIZUMI, T. et al. An improves method for isolation of mouse pancreatic islets. **Transplantation**, v.40, n.4, p.437-438, 1985.
- 26 GRAY, D.W.R.; McSHANE, P.; GRANT, A.; MORRIS, P.J. A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. **Diabetes**, v.33, n.10, p.1055-1061, 1984.
- 27 GRAY, D.W.R.; MORRIS, P.J. Developments in isolated pancreatic islet transplantation. **Transplantation**, v.43, n.3, p.321-331, 1987.
- 28 GRAY, D.W.R.; WARNOCK, G.; SUTTON, R. et al. Succesful auto transplantation of isolated islets of Langerhans in the cynomolgus monkey. **Br. J. Surg.**, v.73, n.10, p.850-854, 1986.

- 29 GREEN, A.; GALE, E.A.M.; PATERSON, C.C. Incidence of childhood onset insulin-dependent diabetes mellitus : the EURODIAB ACE study. **Lancet**, v.339, n.8797, p.905-909, 1992.
- 30 GRILL, V.; WESTBERG, M.; OSTENSON, C.G. Beta cell insensitivity in a rat model of non-insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, v.80, n.3, p.664-669, 1987.
- 31 HALBAN, P.A. Proinsulin trafficking and processing in the pancreatic beta cell. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v.1, n.2, p.261-265, 1990.
- 32 HARA, Y.; TANIGUCHI, Y.; YAMASHIRO, Y. et al. An Improved Method for the Isolation of Islets from the Rat Pancreas. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.91, n.2, p.171-175, 1988.
- 33 HELLERSTRON, C. A method for the microdissection of intact pancreatic islet of mammals. **Acta Endocrinol.**, v.45, n.1, p.122-124, 1964.
- 34 HELLMAN, B. The numerical distribution of the islets of Langerhans at different ages in the rat. **Acta Endocrinol.**, v.32, n.1, p.63-77, 1959.
- 35 HORAGUCHI, A. Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. **Diabetes**, v.30, n.4, p.455- 459, 1981.
- 36 KANNEL, W.; MCGREE, D. Diabetes and cardiovascular disease : the Framingham study. **JAMA**, v.241, n.15, p.2035- 2038, 1979.
- 37 KERGOAT, M.; BAILBE, D.; PORTHA, D. Insulin treatment improves glucose- induced insulin release in rats with NIDDM induced by streptozocin. **Diabetes**, v.36, n.8, p.971-977, 1987.
- 38 KLEIN, R. et al The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy 2 : prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. **Arch. Ophthalmol.**, v.102, p.520-526, 1984.
- 39 KRALL, C.P. The history of diabetes. In: KAHN, C.R. et WEIR, G.C. (eds). **Joslin's Diabetes Mellitus**. 13.ed. Malvern, Pennsylvania : Lea & Febiger, 1994. p.1-14.
- 40 LACERDA, S.N.L. **Diabetes Mellitus na Prática Médica**. 1.ed. Rio de Janeiro : Pirâmide, 1988. Cap. 1: Diabetes Mellitus - uma visão global. p.17-35.
- 41 LACY, P.E. Quantitative histochemistry of the islets of Langerhans. **Diabetes**, v.2, n.1, p.96, 1962.
- 42 LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of intact islet of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v.16, n.1, p.35-39, 1967.
- 43 LEAHY, J.L.; COOPER, H.E.; DEAL, D.A.; WEIR, G.C. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using in vivo glucose infusion. **J Clin. Invest.**, v.77, n.3, p.908-915, 1986.
- 44 LEAHY, J.L.; COOPER, H.E.; WEIR, G.C. Impaired insulin secretion associated with near normoglycemic. Study in normal rats with 96h in vivo glucose infusion. **Diabetes**, v.36, n.4, p.459-464, 1987.

- 45 LEAHY, J.L.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after a incomplete pancreatectomy. **J. Clin. Invest.**, v.81, n.5, p.1407-1414, 1988.
- 46 LEVIN, S.R.; GRODSKY, G.M.; HAGURA, R. et al. Relationship between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfuse rat pancreas. **Endocrinology**, v.90, p.624-631, 1972.
- 47 LIMA, A.O.; SILVA, W.D. **Imunologia Imunopatologia Alergia Métodos**. 1.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1970. p.622.
- 48 MacFARLANE, I.A. The millenia before insulin. In: PICKUP, J.C.; WILLIAMS, G. (eds). **Textbook of Diabetes**. 1.ed. Oxford : Blackwell, 1991. p.3-9.
- 49 MATHIAS, P.C.F. Ação de agentes colinérgicos em ilhotas pancreáticas isoladas. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Inst. de Ciências Biomédicas da USP. São Paulo, 1985.
- 50 McSHANE, P.; SUTTON, R.; GRAY, D.W.R.; MORRIS, P.J. Protease activity in pancreatic islet isolation by enzymatic digestion. **Diabetes**, v.38 (suppl.1), p.126-128, 1989.
- 51 MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of guinea pig. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.5, n.2, p.342-353, 1965.
- 52 NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis of diabetes and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v.28, n.10, p.1039-1057, 1979.
- 53 OKAMOTO, Y.; ISHIDA, H.; TAMINATO, T. et al. Role of cytosolic Ca in impaired sensitivity to glucose of rat pancreatic islets exposed to high glucose in vitro. **Diabetes**, v.41, n.12, p.1555-1561, 1992.
- 54 ORCI, L.; UNGER, R.H.; RAVAZZOLA, M. et al. Chronic glucose infusion increases beta cell GLUT 2. **J. Clin. Invest.**, v.86, n.5, p.1615-1618, 1990.
- 55 PERDRIZET, G.A.; REWINSKI, M.J.; BARTUS, S.A. et al. Albumin improves islet isolation : specific versus nonspecific effects. **Transplantation Proceedings**, v.27, n.6, p.3400-3402, 1995.
- 56 PFEIFER, M.A.; HALTER, J.B.; PORTE, D. Insulin secretion in diabetes mellitus. **The Am. J. of Med.**, v.70, n.3, p.579-588, 1981.
- 57 PHILIPPE, J.; PACHECO, I.; MEDA, P. Insulin gene transcription is decreased rapidly by lowering glucose concentration in rat islet cells. **Diabetes**, v.43, n.4, p.523-528, 1994.
- 58 PORTHA, B.; LEVACHER, C.; PICON, L. et al. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**, v.23, n.11, p.889-895, 1974.
- 59 POZZILI, P. Adjuvant therapy in recent onset type I diabetes at diagnosis and insulin requirement after 2 years. **Diabetes Metab.**, v.21, n.1, p.47-49, 1995.
- 60 PURRELLO, F.; VETRI, M.; GATTA, C. et al. Effects of high glucose on insulin secretion by isolated rat islets and purified beta cell and possible role of glycosilation. **Diabetes**, v.38, n.11, p.1417-1422, 1989.

- 61 RASMUSSEN, H. Physiology and pathophysiology of insulin secretion. **Diabetes Care**, v.13, p.655-666, 1990.
- 62 REDMON, J.B.; TOWLE, H.C.; ROBERTSON, R.P. Regulation of human insulin gene transcription by glucose, epinephrine and somatostatin. **Diabetes**, v.43, n.4, p.546-551, 1994.
- 63 RICORDI, C.; FINKE, E.H.; LACY, P.E. Method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. **Diabetes**, v.35, n.6, p.649-653, 1986.
- 64 RICORDI, C.; LACY, P.E.; FINKE, E.H. et al. The automated isolation method of pancreas islets. **Diabetes**, v.37, n.4, p.413-418, 1988.
- 65 ROBERTSON, R.P.; PORTE, D. The glucose receptor. A defective mechanism in diabetes mellitus distinct from the beta adrenergic receptor. **The J. of Clin. Invest.**, v.52, n.4, p.870-876, 1973.
- 66 ROBERTSON, R.P. Type II diabetes glucose non-sense and islet desensitization. **Diabetes**, v.38, n.12, p.1501-1505, 1989.
- 67 ROBERTSON, R.P.; OLSON, L.K.; ZHANG, H. Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization : a new message from the insulin gene. **Diabetes**, v.43, n.9, p.1085-1089, 1994.
- 68 ROSSETTI, L.; GERALD, I.S.; ZAWALICH, W.; DEFRONZO, R.A. Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion partially pancreatectomized rats. **J. Clin. Invest.**, v.80, n.10, p.1037-1044, 1987.
- 69 SAKO, Y.; GRILL, V.E. Coupling of beta cell desensitization by hyperglycemia to excessive stimulation and circulating insulin in glucose infused rats. **Diabetes**, v.39, n.12, p.1580-1583, 1990.
- 70 SCHARP, D.W. A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. **Diabetes**, v.33, n.11, p.1055-1061, 1984.
- 71 SCHARP, D.W.; LACY, P.E.; FINKE, E.H.; OLACK, B. Low temperature culture of human islets isolated by the distension method and purified with ficoll or percoll gradients. **Surgery**, v.102, n.5, p.869-871, 1987.
- 72 SCHEEN, A.J.; LEFÈBVRE, P.J. Insulin action in man. **Diabetes**, v.22 (suppl.2), p.105-110, 1996.
- 73 SHIBATA, A.; LUDVIGSEN, C.W.; NABER, S.P. et al. Standardization of a digestion-filtration method for pancreatic islets. **Diabetes**, v.25, n.8, p.667-672, 1976.
- 74 SUSSMAN, K.E.; LEITNER, J.W.; DRAZNIN, B. Cytosolic free calcium concentrations in normal pancreatic islet cells. **Diabetes**, v.36, n.5, p.571-577, 1987.
- 75 SUTTON, R.; PETERS, M.; McSHANE, P. et al. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. **Transplantation**, v.42, n.6, p.689-691, 1986.
- 76 TERUYA, M.; IDEZUKI, Y.; BANDAI, Y. et al. New digestion chamber for the automated isolation method of pancreatic islet. **Transplantation Proceedings**, v.26, n.4, p.22-79, 1994.

- 77 THE DCCT RESEARCH GROUP : Diabetes control and complication trial-
results of feasibility study. **Diabetes Care**, v.10, p.1-19, 1987.
- 78 THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION
OF DIABETES MELLITUS : Report of the Expert Committee on the
diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.20,
p.1183-1197, 1997.
- 79 THORENS, B.; WU, Y.J.; LEAHY, J.L.; WEIR, G.C. The loss of GLUT 2
expression by glucose unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and
is induced by the diabetic environment. **J. Clin. Invest.**, v.90, n.1, p.77-85,
1992.
- 80 TSUJI, K.; TAMINATO, T.; USAMI, M. et al. Characteristic features of insulin
secretion in the streptozotocin induced NIDDM rat model. **Metabolism**, v.37,
n.11, p.1040-1044, 1988.
- 81 VAN DER VLIET, J.A.; MELOCHE, R.M.; FIELD, M.J. et al. Pancreatic islets
isolation in rats with ductal collagenase distention, stationary digestion, and
dextran separation. **Transplantation**, v.45, n.2, p.493-495, 1988.
- 82 VAN WART, H.E.; STEIBRINK, D.R. Complementary substrate specificities of
class I and class II collagenases from *Clostridium histolyticum*.
Biochemistry, v.24, p.6520-6526, 1986.
- 83 VERSPOHL, E.; AMMON, H.P.T. Evidence for presence of insulin receptor in
rat islets of Langerhans. **J. Clin. Invest.**, v.65, n.3, p.1230-1237, 1980.
- 84 WARNOCK, G.L. Critical mass of purified islets that induce normoglycemia
after transplantation into dogs. **Diabetes**, v.37, n.4, p.467-470, 1981.
- 85 WELLMANN, K.F.; VOLK, B.W. **The diabetic pancreas**. 1.ed. New York :
Plenum Press, 1977. Cap.1: Historical review, p.1-14.
- 86 WOLTERS, G.H.J.; VAN SUYLICHEM, P.T.R.; VAN DEIJNEN, J.H.M.; VAN
SCHILFGAARDE, R. Factor influencing the isolation process of islets of
Langerhans. **Horm. Metab. Res.**, (suppl.25), p.20-26, 1990.
- 87 ZAWALICH, U.S. Modulation of insulin secretion from beta cells by
phosphoinositide - derived second messenger molecules. **Diabetes**, v.37, n.1,
p.137-141, 1988.
- 88 ZAWALICH, U.S.; ZAWALICH, K.C.; SHULMAN, G.I.; ROSSETTI, L.
Chronic in vivo hyperglycemia impairs phosphoinositide hydrolysis and
insulin release in isolated perfused rat islets. **Endocrinology**, v.126, p.253-
260, 1990.